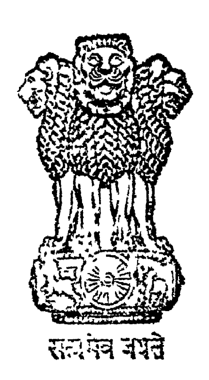

सत्यमेव जयते

Zentralblatt
ür Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten

Begründet von Oskar Uhlworm

Erste Abteilung / 144. Band

Medizinisch-hygienische Bakteriologie, Virusforschung und tierische Parasitenkunde

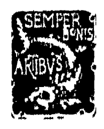
Originale

herausgegeben von

Prof. Dr. E. Gildemeister
Vizepräsident in Berlin-Dahlem

Geh. Reg.-Rat Dr. A. Weber
Präsident i. R. in Berlin NW 87

Mit 48 Abbildungen im Text und 2 Tafeln



Jena
Verlag von Gustav Fischer
1939

Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten

Erste Abteilung / Originale

Beiheft

144. Band — **Ausgegeben am 15. August 1939** — **Heft 1/5**

Bericht über die 1. Großdeutsche (18.) Tagung der „Deutschen Vereinigung für Mikrobiologie" vom 27. bis 30. März 1939 in Wien.

Zusammengestellt von dem Schriftführer der Vereinigung Prof. Dr. med. habil. et phil. Traugott Wohlfeil in Berlin.

1. Tag: Montag, den 27. März 1939.

Eröffnungsansprache. E. Gildemeister (Vorsitzender):

Meine Damen und Herren! Ich eröffne die 18. Tagung der Deutschen Vereinigung für Mikrobiologie und heiße Sie alle herzlich willkommen.

Der Herr Reichsminister des Innern hat mich beauftragt, der Deutschen Vereinigung für Mikrobiologie seine besten Grüße und Wünsche für einen erfolgreichen Verlauf der ersten großdeutschen Tagung zu übermitteln.

Ich begrüße den Vertreter des Reichspropagandaamtes in Wien, Pg. Schee, Se. Magnifizenz den Rektor der Universität Wien, Herrn Prof. Knoll, Se. Magnifizenz den Rektor der Hochschule für Bodenkultur, Herrn Prof. Kaserer, den Vertreter des Rektors der Technischen Hochschule, Herrn Prof. Janke. Ich begrüße ferner die Herren Kollegen aus Italien, Ungarn, Bulgarien, Griechenland, Türkei, Holland, Schweden und Norwegen, die uns die Ehre geben, an unserer Tagung teilzunehmen. Wir haben den lebhaften Wunsch, daß diese Teilnahme der Fachkollegen aus den uns befreundeten Ländern an unseren Verhandlungen nicht eine einmalige Erscheinung sein, sondern zu einer ständigen Einrichtung werden möge. Die persönliche Fühlungnahme und der Meinungsaustausch zwischen ihnen und uns kann unserer Wissenschaft nur förderlich sein.

Ich begrüße weiterhin die naturwissenschaftlichen Bakteriologen, die in stattlicher Zahl der Deutschen Vereinigung für Mikrobiologie beigetreten sind, so daß heute sämtliche deutschen Mikrobiologen sich in unseren Reihen befinden. Ich bin überzeugt, daß dieser Zuwachs sich in unseren Verhandlungen in bester Weise auswirken wird.

M. D. u. H.! Seit unserer letzten Tagung im Jahre 1937 sind aus unseren Reihen durch den Tod abberufen worden die Herren Dr. Herbert Becker-Berlin, Dr. Gegenbauer-Wien, Prof. Dr. Hueppe-Dresden Prof. Dr. Stempell-Münster (Westf.). Wir gedenken fer [...] storbenen Aerzteführers Gerhard Wagner. Die deu [...] t mit ihm ihren Führer, dem sie für seine restlose Hin [...] rpflichtet ist. Wir werden den Verstorbenen stets [...] bewahren. (Die Versammlung hat sich zu Ehren der [...] erhoben.)

M. D. u. H.! Die Deutsche Vereinigung für Mikrobiologie tagt zum dritten Male in Wien. Die erste Tagung fand hier 1909 unter Paltauf, die zweite 1927 unter K. B. Lehmann statt. Unendlich groß und umwälzend sind die Ereignisse, die sich in diesen 3 Jahrzehnten abgespielt haben. Als wir 1927 in Wien tagten, waren unsere Herzen mit Trauer über die Gegenwart und mit Sorge um die Zukunft erfüllt. Unser unvergleichlicher Führer hat uns von Trauer und Sorge befreit und hat uns den Glauben an die deutsche Zukunft wiedergegeben. Mit starker Hand und unbeirrbar seinen Weg verfolgend, hat er uns von Erfolg zu Erfolg geführt. Die Verträge von Versailles und St. Germain sind zerschlagen, Großdeutschland ist erstanden. Zum ersten Male können sich die deutschen Mikrobiologen im Großdeutschen Reich zu einer Tagung vereinen. Dafür danken wir dem Führer auch von dieser Stelle aus und geloben unwandelbare Treue. Wir grüßen unseren Führer: Adolf Hitler Sieg Heil!

Knoll begrüßt als Rektor der Universität Wien die Anwesenden und wünscht der Tagung einen guten Verlauf.

M. Eugling begrüßt als Hausherr die Tagungsteilnehmer und heißt sie herzlich willkommen.

Begrüßungsansprache: A. Azzi (Turin):

Es ist für mich eine große Ehre, als Präsident der italienischen Gesellschaft für Mikrobiologie und als Rektor der Königl. Universität von Turin Herrn Prof. Wohlfeil und den deutschen Mikrobiologen für die freundliche Einladung meinen besten Dank auszusprechen und meinen herzlichsten Gruß bringen zu können. Diese Aufgabe ist mir besonders willkommen, um so mehr, als ich vor kurzem zur Präsidenz der Piemontesischen Abteilung der deutsch-italienischen Kulturgesellschaft berufen wurde.

Die großen geschichtlichen Ereignisse, die wir erleben, sind die Vorboten einer neuen großen Zeit, die an Große alle übrigen überragen wird. Diese Ereignisse werden die bereits bestehende geistige Gemeinschaft unserer Völker in eine gewaltige Kohäsion bringen, die ihnen gestatten wird, unter der Leitung ihrer großen Führer zusammen den Weg der Ehre und des Sieges zu marschieren. Wir Wissenschaftler haben die verantwortungsvolle Pflicht, die geistigen Grundlagen dieses großen Bündnisses immer tiefer und kräftiger zu gestalten, denn nur eine tief geistige Gemeinschaft trägt in sich die Bürgschaft, daß der Bund aus allen Kämpfen siegreich hervorgehen und seine große Zukunft erobern kann. Ich erneuere nochmals meinen besten Dank und rufe vom Herzen Heil unseren kulturreichen Völkern und ihren großen Führern. Heil Hitler! Viva Mussolini!

Begrüßungsansprache: W. N. Markow (Sofia):

Es ist eine ganz besondere Ehre für mich, in Ihrer Mitte an der ersten großdeutschen Tagung der Deutschen Vereinigung für Mikrobiologie teilnehmen zu dürfen. Ihre Einladung an mich ist der Ausdruck der Wertschätzung aller Kollegen meines Heimatlandes, die ich als Vorsitzender des Bulgarischen Mikrobiologischen Vereins heute zu vertreten die große Genugtuung habe. Im Namen meiner Kollegen und in meinem eigenem bitte ich Sie, den Ausdruck der lebhaften Sympathien der bulgarischen Kollegen südlich der Donau entgegennehmen zu wollen.

Diese Uebermittlung ist mir Bedürfnis und Pflicht zugleich, denn in Bulgarien gibt es kaum einen Bakteriologen, sowohl für humane wie für

veterinäre Medizin, der in seiner Ausbildung nicht durch das Institut „Robert Koch“ und durch das Reichsgesundheitsamt gegangen wäre.

Die Sofianer Alma mater darf sich rühmen, auf ihren Lehrstühlen Vertreter der deutschen Wissenschaft gesehen zu haben — in der jüngsten Fakultät, der Veterinärmedizinischen auf Jahre, bis zur Schulung bulgarischer Kräfte.

Alljährlich haben wir die Freude, die bedeutendsten Vertreter aller Disziplinen als Gastvortragende zu hören. Die Wissenschaft, die uns heute hier vereinigt, hat durch den Mund Berufener, wie Uhlenhuth, von Ostertag, Bongert, Rihlke, Schlossberger, Gins zu den bulgarischen Kollegen, wie zur bulgarischen Studentenschaft gesprochen.

So haben sich die wissenschaftlichen Beziehungen zwischen Deutschland und Bulgarien bewährt und vertieft trotz mancher Ungunst der Zeit — ein Beweis dafür, wie natürlich und unmittelbar diese Beziehungen sind. Ich darf die Zuversicht zum Ausdruck bringen, daß diese Beziehungen ungemindert fortbestehen werden.

Möge die deutsche Wissenschaft durch ihre verdienten und anerkannten Vertreter den Ruhm Deutschlands — wie bisher — in alle Zukunft tragen.

Begrüßungsansprache: J. v. Daranyi (Budapest)[1]):

Ich begrüße herzlichst die Tagung der deutschen mikrobiologischen Vereinigung bei diesem angenehmen gesellschaftlichen Abend, da ich verhindert war, an der Eröffnungssitzung teilzunehmen. Ich tue es auch im Namen der ungarischen Gäste, die so zahlreich an der Tagung teilnahmen und auch an dem wissenschaftlichen Programm sich lebhaft beteiligten.

Die ungarische Gruppe sieht es mit Genugtuung, daß ein Teil der Kongreßteilnehmer uns in Budapest besuchen wird. Wir werden natürlich alles aufbieten, diesen Ausflug am angenehmsten zu gestalten. Ich möchte auch hoffen, daß sich noch weitere Teilnehmer zu dem Ausflug melden werden.

Mit Prof. Tomcsik zusammen spreche ich auch den innigsten Dank für die große Ehrung aus, welche der Kongreß uns gegenüber damit erwies, daß er uns zu Korrespondierenden Mitgliedern der deutschen Mikrobiologischen Vereinigung gewählt hat. Ich sehe in dieser Wahl nicht nur eine Stärkung der wissenschaftlichen Beziehungen beider Nationen, sondern auch ein Zeichen, einen Ausdruck des Wohlwollens und der Freundschaft.

In der Ueberzeugung der weiteren Entwicklung der deutsch-ungarisch wissenschaftlichen Beziehungen erhebe ich mein Glas auf die Freundschaft unserer Nationen.

Geschäftlicher Teil.

Auf Vorschlag des Ausschusses erfolgt die Wiederwahl des bisherigen Vorsitzenden, Prof. Dr. E. Gildemeister-Berlin, der die Wahl mit Dank annimmt und die bisherigen Ausschußmitglieder in ihrem Amte bestätigt.

Zu korrespondierenden Mitgliedern der Deutschen Vereinigung für Mikrobiologie werden ernannt die Herren Prof. Azzi-Turin, Prof. Gornni-Mailand, Prof. v. Darányi-Budapest, Prof. Tomcsik-Budapest und Prof. Dr. Markow-Sofia.

Als Tagungsort für die nächste Tagung wird Breslau in Aussicht genommen.

Der Jahresbeitrag wird auf 5 RM (für Assistenten auf 3 RM) festgesetzt.

---

1) Begrüßungsrede anläßlich des Festessens am 28. März 1939.

Wissenschaftliche Sitzung.

Vormittags.
Versammlungsleiter: Kißkalt (München) und David (Wien).
Nachmittags.
Versammlungsleiter: Eugling (Wien) und Schlossberger (Berlin).

Sammelbericht I. R. Prigge (Frankfurt a. M.)[1]:

Bakteriologie, Immunbiologie und Epidemiologie der Bazillenruhr.

I.

Es wird vielen von Ihnen noch erinnerlich sein, daß der Streit um die Einteilung der Ruhrbazillen noch vor etwa zehn Jahren die Diskussion in ganz ungewöhnlichem Maße beherrscht hat. Dieser Streit hat zwar seine Aktualität längst verloren; er ist aber niemals zu einer allgemein angenommenen Entscheidung gelangt. Es kommt also darauf an, zunächst einmal die gesicherten Tatsachen festzustellen und die strittigen Auffassungen scharf von ihnen zu trennen.

Die Ruhrbazillen sind kurze, bei allen Temperaturen unbewegliche, geißellose, gramnegative Stäbchen ohne Sporen. Sie sind fakultative Anaerobier, vermögen Gelatine nicht zu verflüssigen. Sie vergären Glukose ohne Gasbildung; keiner von ihnen vermag — wie ich hier vorwegnehmen möchte — Dulzit zu vergären.

Kulturell zerfallen die Ruhrbazillen in zwei große Gruppen, solche, die Mannit nicht zu vergären vermögen, und solche, die Mannit angreifen. In der Mannit-negativen Gruppe finden wir den Shiga-Kruse-Bazillus und den Schmitz-Bazillus, die sich vor allem durch ihr Verhalten in Trypsinbouillon und gegenüber Rhamnose unterscheiden: nur der Schmitz-Bazillus bildet Indol und greift Rhamnose an.

Die Mannit-positive Gruppe umfaßt Keime, die Laktose und Rhamnose nicht oder nur in geringem Maße angreifen: die (in zahlreiche serologische Rassen zerfallende) Flexner-Gruppe, und einen Bazillus, der diese beiden Zuckerarten, vor allem die Rhamnose sehr schnell, zu spalten vermag: den B. Kruse-Sonne. Tabelle I gibt eine Uebersicht über diese Verhältnisse.

Tabelle I.
Die wichtigsten kulturellen Unterscheidungsmerkmale der Ruhrbazillen.

	Shiga-Kruse-Bazillus	Schmitz-Bazillus	Flexner-Gruppe	Kruse-Sonne-Bazillus
Mannit	—	—	+	+
Laktose	—	—	—	+
Rhamnose	—	+	—	+
Indol	—	+	+/—	—

Neben diesen allgemein anerkannten Gruppen und Arten von Ruhrbazillen müssen nach Auffassung verschiedener Autoren noch zwei weitere Ruhrbazillen angenommen werden, die sich durch Aufteilung der Flexner-Gruppe ergeben

1) Aus dem Staatl. Institut für experimentelle Therapie, Frankfurt/Main.

sollen, und zwar der Hiss-Russelsche Bazillus (auch Bac. Y genannt) und der Strongsche Bazillus. Während der „eigentliche“ Flexner-Bazillus Maltose vergärt, sollen der Hiss-Russelsche und der Strongsche Bazillus hierzu nicht imstande sein. Und die beiden letzteren sollen sich wieder dadurch unterscheiden, daß nur der Strongsche Bazillus Saccharose zu spalten vermag. Tabelle II gibt eine Uebersicht über diese Unterscheidungsmerkmale.

Tabelle II.
Aufteilung der Flexner-Gruppe nach ihrem kulturellen Verhalten.

	„Bazillus Flexner“	„Baz. Hiss-Russel“	„Bazillus Strong“
Maltose	+	—	—
Saccharose	—	—	+

An der Tatsache, daß gewisse Keime der Flexner-Gruppe Maltose und Saccharose zu vergären vermögen, ist nun in der Tat nicht zu zweifeln. Durch die grundlegenden Untersuchungen von Kruse, Rittershaus, Kemp u. Metz (1) ist aber erwiesen, daß die Fähigkeit der Flexner-Bazillen, Maltose zu spalten, starken zeitlichen Schwankungen unterliegt. Eine und dieselbe Kultur kann einmal Maltose vergären, ein anderes Mal nicht. Es kommt auch vor, daß man beim gleichen Patienten einmal Keime findet, die Maltose vergären, ein anderes Mal solche, die die Maltose nicht angreifen, sich aber sonst weder kulturell noch serologisch irgendwie unterscheiden [Braun (2)]. Auch die umfangreichen Arbeiten von Andrewes u. Inman (3) haben gezeigt, daß das Verhalten der Flexner-Bazillen gegenüber Maltose sehr variabel ist, und sie lehnen es daher ab, eine Unterteilung der Flexner-Bazillen auf Grund dieses Verhaltens vorzunehmen.

Gegen die Auffassung von Kruse und von Andrewes kann nun geltend gemacht werden, daß die Unterscheidung nach demjenigen Verhalten durchgeführt werden müsse, welches ein Stamm unmittelbar nach seiner Isolierung zeigt, gleichgültig, wie er sich später verhält. Immerhin ist schwer einzusehen, warum ein Stamm, der zu einem beliebigen Zeitpunkt Maltose angreift, nur deshalb als Hiss-Russel-Bazillus bezeichnet werden soll, weil er früher einmal — bei seiner Isolierung — Maltose nicht zu vergären vermochte, und warum ein anderer Stamm, der Maltose nicht vergärt, als Flexner-Bazillus gelten soll, nur weil er bei seiner Isolierung hierzu imstande war.

Ganz ähnlich wie gegenüber der Maltose verhalten sich die Keime der Flexner-Gruppe gegenüber der Saccharose. Vor allem haben Hiss u. Russel sowie Shiga festgestellt, daß auch Maltosevergärer, also „eigentliche“ Flexner-Bazillen imstande sind, Saccharose anzugreifen. Zu dem gleichen Ergebnis sind Andrewes u. Inman (3) gelangt. Nach ihren Feststellungen kommt es häufig vor, daß ein und derselbe Stamm die Fähigkeit, Saccharose zu vergären ebenso verliert und wiedergewinnt wie das Vermögen, Maltose anzugreifen.

Faßt man diese Feststellungen, denen heute nirgends mehr ernstlich widersprochen wird, zusammen, so darf man sagen, daß die Keime der Flexner-Gruppe Maltose und Saccharose zwar zu vergären vermögen, aber in stark wechselndem Maße. Es sei noch hinzugefügt, daß auch das Indolbildungsvermögen der Flexner-Bazillen Schwankungen unterliegt und daher ebensowenig wie das Verhalten gegenüber Maltose als Einteilungsmerkmal verwandt werden kann [Andrewes u. Inman (3)]. Da Differenzierungsmerkmale, die sich regelmäßig, also ohne wesentliche zeitliche Schwankungen, nachweisen lassen, nicht bekannt sind, dürfte also eine Aufteilung der Flexner-Gruppe auf Grund ihres kulturellen Verhaltens nicht möglich sein.

Um Mißverständnisse zu vermeiden, möchte ich ausdrücklich darauf hinweisen, daß die bisher erwähnten Eigenschaften der Ruhrbazillen nicht etwa im Hinblick auf ihre Bedeutung für die praktische Ruhrdiagnostik besprochen wurden. Im Rahmen dieses Referates kommt es vielmehr in erster Linie darauf an, eine scharfe Definition der Ruhrbazillen zu geben, und mit Rücksicht auf die völlige Eindeutigkeit der Abgrenzungen müssen auch Eigenschaften erörtert werden, die in der Praxis keine wesentliche Rolle spielen. Immerhin gehen die theoretischen und die praktischen Fragestellungen ineinander über. Das gilt vor allem für die Laktose. Nicht nur der Kruse-Sonne-Bazillus vermag diesen Zucker zu vergären, sondern auch der Flexner-, ja sogar der Shiga-Kruse-Bazillus, allerdings nur in ganz geringen Mengen [Andrewes u. Inman (3)]. Die hierdurch bedingte Säuerung der Nährböden wird durch Alkalibildung stets wieder rückgängig gemacht. Der Kruse-Sonne-Bazillus greift Laktose dagegen sehr viel stärker an; die Säurebildung ist hier kein vorübergehendes Phänomen, sondern sie hält an. Allerdings dauert es oft mehrere Tage, manchmal sogar Wochen, bis sich die definitive Säuerung des Nährbodens einstellt. So wichtig also das Verhalten der Kruse-Sonne-Bazillen gegenüber Laktose in theoretischer Hinsicht ist — sie werden ja auch geradezu als „Milchzuckerrasse" bezeichnet — so wenig eignet es sich zum raschen diagnostischen Nachweis. Die Rhamnose-Nährböden sind hier bei weitem vorzuziehen.

An drei Beispielen sei noch gezeigt, wie schwierig die einwandfreie kulturelle Identifizierung von Ruhrbazillen und ihre Unterscheidung von gewissen Saprophyten manchmal sein kann:

1. Der B. fallax läßt sich vom Schmitz-Bazillus nur dadurch unterscheiden, daß er Saccharose vergärt [Ornstein (5) u. a.].

2. Der B. alcalescens zeigt weiteste Uebereinstimmung in seinen Eigenschaften mit dem Flexner-Bazillus, hat aber vor diesem vor allem die Fähigkeit, Dulzit zu vergären, voraus. Es wurde bereits eingangs erwähnt, daß die Ruhrerreger hierzu sämtlich unfähig sind [Andrewes u Inman (3)].

3. Ein als B. dispar bezeichneter Milchzuckervergärer bildet Indol, während der B. Kruse-Sonne indolnegativ ist. Andere kulturellen Unterschiede zwischen diesen beiden Keimen bestehen nicht, so daß sie lange Zeit als eng zusammengehörig galten [Andrewes u. Inman (3)].

Glücklicherweise kommen die erwähnten Saprophyten nur selten vor. Zudem macht ihr serologisches Verhalten jede Verwechslung mit Ruhrerregern unmöglich. Auch mit Hilfe spezifischer Bakteriophagen lassen sich Ruhrbazillen von Saprophyten und Shiga-Kruse-Bazillen von Flexner-Bazillen usw. unterscheiden [Miller (31) u. a.].

II.

Bevor ich auf die serologischen Eigenschaften der Ruhrbazillen eingehe, möchte ich zur Vermeidung von Verwechslungen einige allgemeine Bemerkungen über Agglutinogene vorausschicken. Drei verschiedene Einteilungsprinzipien haben hier Bedeutung gewonnen.

1. Durch die Untersuchungen von Smith u. Reagh (6) und Beyer u. Reagh (7) wissen wir, daß die Angehörigen der Typhus-Paratyphus-Gruppe ein im Bakterienleib enthaltenes, thermostabiles und ein im Geißelapparat enthaltenes thermolabiles Antigen besitzen. Weil u. Felix haben das erstere später als O-Antigen, das letztere als H-Antigen bezeichnet. Die geißellosen O-Formen enthalten nur das O-Antigen, während die begeißelten H-Formen sowohl das O- als auch das H-Antigen enthalten.

2. Andrewes (8) hat gezeigt, daß viele begeißelten Keime in zwei „Phasen" vorkommen, einer spezifischen und einer unspezifischen. Die beiden Phasen unterscheiden sich durch die Eigenschaften des in ihrem Geißelapparat enthaltenen Agglutinogens, also des H-Antigens. Wie Kauffmann u. Mitsui (9) festgestellt haben, kommen manche Keime sogar in zwei spezifischen Phasen vor, die die Bezeichnung α und β erhalten haben; diesen Keimen fehlt allerdings die unspezifische Phase.

3. Schließlich hat Arkwright (10) nachgewiesen, daß ein und dieselbe Keimart in zwei Kolonieformen vorkommen kann, einer glatten und einer rauhen; die glatte wird als S-Form bezeichnet, die rauhe als R-Form. Am besten untersucht sind diese Verhältnisse bei den Pneumokokken, bei denen die S-Form ein spezifisches Kohlehydrat besitzt, das der R-Form fehlt. Auch bei den begeißelten Bakterien kommen S- und R-Formen vor; sie sollen sich — ebenso wie die Pneumokokken — nicht nur morphologisch, sondern auch durch die Eigenschaften des im Bakterienleib enthaltenen Antigens unterscheiden. Nur die S-Form soll das O-Antigen enthalten, während die R-Form nach White (11) ein ebenfalls thermostabiles, aber vom O-Antigen ganz verschiedenes Agglutinogen besitzt. Für das letztere gibt es meines Wissens keine besondere Benennung; es sei daher zur Unterscheidung hier als „o-Antigen" bezeichnet.

Faßt man alle diese Merkmale zusammen, so ergibt sich für ein und denselben Keim eine beträchtliche Zahl von Varianten. Tabelle III zeigt, wie die verschiedenen Merkmale miteinander verknüpft sind.

Tabelle III.
Antigenstruktur der verschiedenen Varianten einer begeißelten, zweiphasischen Keimart.
(Schema[1].)

	S-Form	R-Form
Unbegeißelte Varianten	0	o
Begeißelte Varianten {spezifische Phase	0 + H α	o + H α
Begeißelte Varianten {unspezifische Phase[2]) . .	0 + H u	o + H u

1) Das Vi-Antigen, das hier nicht aufgeführt ist, ist im Bakterienleib enthalten und soll dem 0-Antigen nahestehen.
2) Bei anderen zweiphasischen Keimen kennt man — an Stelle der unspezifischen — eine weitere spezifische Phase mit dem Antigen H β.

Da die Ruhrbazillen unbegeißelt sind, liegen die Verhältnisse im Ganzen einfacher als bei den Keimen der Typhus-Paratyphus-Gruppe; wir haben es hier in erster Linie mit den Antigenen 0 und o zu tun. Es hat sich aber gezeigt, daß die morphologischen und die serologischen Eigenschaften der Ruhrbazillen, zumindest der Shiga-Kruse-Bazillen nicht in Parallele gesetzt werden können.

Gildemeister war wohl der erste, der bei Shiga-Kruse-Bazillen die Kolonieformen beobachtet hat, die heute als R-Formen bezeichnet werden. Jedoch hat man den Unterschieden in der Kolonieform früher wenig Beachtung geschenkt. Es ist aber in der Tat festzustellen, daß die verschiedenen Shiga-Kruse-Stämme sich durch ihre Kolonieform meist recht deutlich unterscheiden. Die S-Formen bilden glatte Kolonien und wachsen diffus in Bouillon, während die R-Formen rauhe Kolonien liefern und sich beim Wachstum in Bouillon zu Boden senken und leicht verklumpen. Die beiden Formen sind ziemlich konstant. Jedoch können sie bisweilen auch ineinander übergehen; wenigstens können sich bei einem in S-Form wachsenden Stamm nach längerer Züchtung auch R-Kolonien neben den S-Kolonien entwickeln. Besonders eingehende Untersuchungen über die S- und R-Formen des Shiga-Kruse-Bazillus haben in den letzten Jahren Boivin u. Mesrobeanu [vollständige Literaturzusammenstellung s. (13)] angestellt. Sie kamen zu dem Ergebnis, daß die beiden Formen auch serologisch streng unterscheidbar seien, und zwar sollen die S-Stämme das typische 0-Antigen regelmäßig enthalten, während es den R-Stämmen regelmäßig fehlt. Haas (12) konnte aber nachweisen, daß dies nicht zutrifft. Zweifellos gibt es zwar zwei serologisch differente Arten von Shiga-Kruse-Stämmen, die sich durch das Vorhandensein bzw. das Fehlen des 0-Antigens unterscheiden. Die 0-Agglutination entspricht dem körnigen Typ; die sich bildenden Flocken sind schwer zerschüttelbar. Aber das 0-Antigen findet sich auch bei manchen R-Stämmen, und umgekehrt fehlt es manchen S-Stämmen. Boivin hat diese Feststellung bestätigt. Die morphologischen Unterschiede zwischen den Shiga-Kruse-Stämmen dürften also von geringerer Bedeutung sein als die serologischen. Aber auch die antigenen Qualitäten scheinen nicht fix zu sein; z. B. konnte Istrati (mündl. Mitteil.) durch Züchtung eines 0-haltigen Stammes in 0-Serum eine 0-freie Variante gewinnen, die sich bis jetzt viele Monate lang 0-frei erhalten hat. Mit den Ursachen dieser Phänomene und der genauen Charakterisierung des „0-Antigens" werden wir uns später noch eingehend beschäftigen.

Etwas einfacher liegen die Verhältnisse bei den Kruse-Sonne-Bazillen. Hier wissen wir seit langem, daß die morphologischen und die serologischen Eigenschaften übereinstimmen. Die S-(g-)Formen werden nur durch S-Serum agglutiniert, und zwar grobflockig bzw. körnig, also mit einer 0-Agglutination, die R-(fl-)Formen dagegen nur durch R-Serum, und zwar feinflockig. Hier haben wir also eine eindeutige Zuordnung von S zu 0 einerseits und von R zu o andererseits.

Wie wir sahen, kommen die Shiga-Kruse- und die Kruse-Sonne-Bazillen in zwei serologischen Varianten vor. Trotzdem können wir bei ihnen nicht etwa von verschiedenen „Rassen" sprechen. Es handelt sich im Grunde doch immer um die gleiche Keimart, die ihr 0-Antigen einmal bildet und einmal nicht bildet. Die 0-haltige Variante vermag in die 0-freie Variante überzugehen. Anders liegen die Verhältnisse bei den Schmitz-Bazillen. Hier gibt es bekanntlich zwei verschiedene Rassen: die von Kruse beschriebene Rasse „Dösen" (= Rasse I) und die „eigentliche" Schmitz-Rasse (= Rasse J). Untersuchungen von Haas (12) haben diese Tatsache neuerdings wieder bestätigt. Er konnte feststellen, daß das 0-Antigen eines zur Rasse I gehörigen Schmitz-Stammes eine ausgesprochene Rezeptorengemeinschaft mit dem 0-Antigen verschiedener Flexner-Stämme zeigte, während alle übrigen Stämme ein anderes, offenbar das die J-Rasse charakterisierende 0-Antigen besaßen. Sein Ergebnis steht in vorzüglicher Uebereinstimmung mit Beobachtungen von Sartorius u. Reploh (14): diese Autoren haben 3 mannitnegative, ihrem kulturellen Verhalten nach wohl als Schmitz-Bazillen anzusprechende Stämme beschrieben, die sich serologisch wie gewisse Flexner-Bazillen (F-Rasse nach Kruse) verhielten. Neben den erwähnten beiden 0-haltigen Rassen, die sämtlich in S-Form wuchsen, hatte Haas auch zwei Stämme in Händen, die nur R-Kolonien aufwiesen und kein 0-Antigen bildeten; über ihren Zusammenhang mit 0-haltigen Stämmen ist nichts bekannt.

Völlig unübersichtlich sind die Verhältnisse bei den Flexner-Bazillen. Zwar haben die Untersuchungen von Kruse, Rittershaus, Kemp u. Metz, von Andrewes u. Inman, von Sartorius, von Clauberg, von Kalic u. a. einwandfrei erwiesen, daß die Flexner-Bazillen in zahlreiche serologischen Rassen zerfallen. Aber von einer einheitlichen Klassifikation und Nomenklatur sind wir noch weit entfernt. Da Boivin u. Mesrobeanu (13) gezeigt haben, daß bei den Flexner-Bazillen — ebenso wie bei den Shiga-Kruse-, den Kruse-Sonne- und den Schmitz-Bazillen — neben Stämmen, die das 0-Antigen enthalten, solche vorkommen, die kein 0-Antigen bilden, kann vorläufig überhaupt nichts darüber ausgesagt werden, wie weit die von den verschiedenen Autoren beschriebenen „Rassen" der Flexner-Bazillen wirklich verschieden waren und wie weit es sich hier nur um 0-haltige und 0-freie Varianten gehandelt hat. Die neuerdings bei den drei anderen Ruhrbazillen gewonnenen Erkenntnisse machen es notwendig, die Untersuchungen über die Rassen des Flexner-Bazillus nochmals von Grund auf zu revidieren. Es muß auch geprüft werden, ob sich die Rassenunterschiede nur im 0-Antigen ausdrücken, so daß also nur eine einzige o-Form vorkäme, oder ob jedem 0-Antigen auch ein besonderes o-Antigen entspricht. Im Rahmen dieses Referates möchte ich mich darauf beschränken, Ihnen eine kurze vergleichende Uebersicht über die Ergebnisse einiger Untersucher (Tab. IV) vorzuführen, wobei ich bemerke, daß die von Kruse als A, D und H bezeichneten Rassen wohl jetzt schon als am besten gesichert gelten dürfen. Eine Gewähr für die Uebereinstimmung der verschiedenen Bezeichnungen kann ich nicht übernehmen; ich stütze mich hier lediglich auf Literaturangaben, insbesondere auf die Arbeiten zur Rezeptorenanalyse,

die Andrewes u. Inman (3), Clauberg (63, 64), Kalic (65) und Sartorius (14, 49, 66) veröffentlicht haben. Bezüglich der ins Einzelne gehenden Antigenstruktur-Schemata sei auf die Originalpublikationen verwiesen.

Tabelle IV.
Vergleichende Uebersicht über die verschiedenen serologischen Rassen der Flexner-Bazillen.

Kruse	Andrewes (Kalic)	Sartorius	Clauberg	Aoki	Synonyma
A	VZ	A (Gruppe 1)	A	?	Pseudodysenterie der Irren
B	V	BC (Gruppe 2)	B	5	Flexner-Bazillus
C	?	?	?	?	—
D	W; Y[1])	D (Gruppe 4)	D	1	Hiss-Russel-Bazillus
F	?	F[2])	F[5])	3; 6[6])	—
G	?	G[3])	?	4; 12[7])	Strong-Bazillus
H	Z	H (Gruppe 3)	H	2 (10?)	—
?	?	K	?	9	—
?	?	L	?	?	—
?	WX	?	?	?	—
?	X	X	?	10 (2?)	—
?	?	Y_1; Y_2 [1])	?	?	—

1) Nach Sartorius: D-Kruse = W-Andrewes plus Y-Andrewes; nach Kalic und Clauberg dagegen: D-Kruse = Y-Andrewes.
2) nicht identisch mit F-Kruse und F-Clauberg.
3) nicht identisch mit G-Kruse.
4) nicht identisch mit Y-Andrewes.
5) nicht identisch mit F-Kruse und F-Sartorius.
6) identisch nur mit T-Sartorius.
7) identisch nur mit GSartorius.

Ich möchte noch hinzufügen, daß Boivin u. Mesrobeanu (13) auch bei den Flexner-Bazillen das 0-Antigen stets in den S-Formen, nie in den R-Formen gefunden haben. Haas (12) konnte diese Feststellung bestätigen; vielleicht ist also bei den Flexner-Bazillen der Parallelismus zwischen morphologischer und serologischer Struktur vollständiger als bei den Shiga-Kruse-Bazillen. Ob aus den S-Formen der Flexner-Bazillen die R-Formen durch unmittelbare Umwandlung entstehen, ist noch nicht geklärt, wenn auch überaus wahrscheinlich. Takita (26) will eine Art „Phasenwechsel" beobachtet haben. Vielleicht handelt es sich hier um den in Betracht kommenden Uebergang.

III.

Wir wenden uns jetzt zur Frage nach der Natur der verschiedenen, von den Ruhr-Bazillen gebildeten 0-Antigene. Diese Frage hat, wie wir sehen werden, nicht nur für die bakteriologische Diagnostik, sondern in weit höherem Maße für die Pathogenese der Bazillenruhr Bedeutung gewonnen.

Daß der Shiga-Kruse-Bazillus ein echtes Toxin bildet, ist eigentlich nie bestritten worden; es handelt sich hier um ein thermolabiles, mit voller antigener Wirksamkeit ausgestattetes Gift, das durch homologes Antitoxin in verhältnismäßig hohen Mengen neutralisiert wird. Wenn Okell u. Blake (15) dieses Gift wegen seiner starken Anreicherung in der Leibessubstanz der Bakterien als „Endo"-Toxin auffassen wollen, so handelt es sich hier lediglich um einen Streit um Worte; denn für die Klassifizierung eines solchen Giftstoffes ist es völlig belanglos, ob er von der Bakterienzelle intra vitam sezerniert oder erst post mortem infolge autolytischer Prozesse freigelassen wird.

Sehr viel wesentlicher ist, daß neben dem Toxin von zahlreichen Autoren seit jeher ein wirkliches Endotoxin angenommen worden ist, ein an die

Leibessubstanz des Shiga-Kruse-Bazillus besonders fest, aber ebenfalls nicht unlösbar gebundenes Gift, welches erst bei fortgeschrittener Autolyse der Bakterienzelle frei wird und ganz andere Eigenschaften besitzt als das Toxin [Kruse, Selter, Pfeiffer u. Ungermann, Kraus u. Dörr, Olitzky u. Kligler, Literatur s. bei Lentz u. Prigge (4) und bei Prigge (16)]. Tabelle V gibt Ihnen eine Uebersicht über die verschiedenen, auf Grund der älteren Arbeiten ermittelten Eigenschaften der beiden Gifte des Shiga-Kruse-Bazillus.

Tabelle V.
Eigenschaften des Shiga-Kruse-Toxins und des -Endotoxins (auf Grund der älteren Angaben).

Toxin	Endotoxin
thermolabil	thermostabil
neurotoxisch (paretisch)	enterotoxisch (marantisch)
für Kaninchen hochtoxisch	für Meerschweinchen hochtoxisch
hohe antigene Wirksamkeit	schwache antigene Wirksamkeit

Trotzdem zahlreiche Untersuchungen für das tatsächliche Vorhandensein eines vom Toxin gänzlich verschiedenen Endotoxins sprachen, wurden lange Zeit immer wieder Zweifel an seiner Existenz geäußert. Erst in den letzten 6 Jahren konnten die endgültigen und unwiderlegbaren Beweise für die Unhaltbarkeit der monistischen Auffassung des Ruhrgiftes erbracht werden; zugleich sind — mit geringen Einschränkungen, die die Empfindlichkeit der verschiedenen Tierarten betreffen — alle dem Endotoxin von jeher zugesprochenen Eigenschaften tatsächlich nachgewiesen worden. Es muß allerdings zugegeben werden, daß nicht alle Stämme des Shiga-Kruse-Bazillus das Endotoxin enthalten, sondern nur die eine der beiden serologischen Varianten, und zwar diejenige, die wir bis jetzt vorläufig als die 0-haltige bezeichnet haben, also die Variante, die körnige Agglutination gibt. Die erwähnten Feststellungen sind auf ganz verschiedenen Wegen von Boivin u. Mesrobeanu (13), von Raistrick u. Topley (17), von Morgan (18) und von Morzycki u. Zabłocki (29) gemacht worden.

Nach Boivin u. Mesrobeanu werden zwei Wochen alte Kulturfiltrate des Shiga-Kruse-Bazillus und zahlreicher anderen gramnegativen Bazillen mit Trichloressigsäure versetzt. Es bildet sich hierbei ein weißlicher Niederschlag, der in Sodalösung leicht löslich ist. Der Niederschlag enthält einen proteinartigen Körper, das Toxin. Aus der überstehenden Flüssigkeit läßt sich nach Neutralisation oder Dialyse durch Alkohol eine Kohlehydrat-Lipoid-Verbindung ausfällen, die ebenfalls giftig ist, aber völlig andere Eigenschaften besitzt, das Endotoxin. Nach Untersuchungen von Morgan (32) enthält der Polysaccharid-Anteil 15 Proz. d-Galaktose, 7,5 Proz. l-Rhamnose und 25 Proz. N-Azetyl-aminozucker. Boivin hat sein Darstellungsverfahren später geändert; da es ihm nur auf die Gewinnung des Endotoxins ankommt, behandelt er 24stünd. Agarkulturen, die mit physiologischer NaCl-Lösung abgeschwemmt und gewaschen werden, mit Trichloressigsäure. Hierbei bleibt das in Trichloressigsäure unlösliche Toxin in den Bakterien zurück, während das Endotoxin extrahiert wird. Ich habe das von Boivin angegebene Verfahren gemeinsam mit Herrn Dr. Wagner-Jauregg, Fräulein Kicksch und Fräulein Dr. Helmert nachgeprüft und in allem Wesentlichen bestätigen können. Herr Wagner-Jauregg wird Ihnen über die Ergebnisse unserer Untersuchungen, soweit sie abgeschlossen sind, nachher berichten.

An Stelle der Trichloressigsäure verwendet Morgan Diäthylenglykol, in dem ebenfalls das Toxin unlöslich, das Endotoxin löslich ist. Morgan (18) hat auch interessante Beziehungen zwischen dem Shiga-Kruse-Endotoxin und dem Forssmanschen heterogenetischen Antigen festgestellt. Raistrick u. Topley haben ihre Versuche nicht mit Ruhrbazillen, sondern nur mit Typhus- und Mäusetyphus-Bazillen durchgeführt, haben aber im Prinzip das gleiche Ergebnis erzielt wie Boivin und Morgan: sie zerstören den Zellverband und seine eiweißartigen Bestandteile, insbesondere das Toxin durch Verdauung mit Trypsin und Erepsin und fällen das Endotoxin aus der Verdauungslösung mit Alkohol aus. Morzycki u. Zabłocki (29) gewinnen das Endotoxin, indem sie die Shiga-Kruse-Bazillen gefrieren und wieder auftauen lassen und aus dem Extrakt — nach Filtration — den Polysaccharidkomplex durch Alkoholfällung darstellen.

Von besonderer Wichtigkeit sind die immunbiologischen Eigenschaften des Shiga-Kruse-Endotoxins. Wie die Untersuchungen von Boivin u. Mesrobeanu, Morgan u. a. ergeben haben, erzeugt das Endotoxin Antikörper, durch die es in durchaus spezifischer Weise präzipitiert wird. Das Endotoxin ist somit ein echtes Präzipitinogen, also ein Vollantigen, und unterscheidet sich hierdurch von den nur präzipitablen, aber im allgemeinen nicht präzipitinogen wirkenden Kohlehydraten der Pneumokokken. Darüber hinaus bewirken die mit Endotoxin hergestellten Seren auch die Agglutination der Shiga-Kruse-Bazillen, aber nur solcher Stämme, die selbst das Endotoxin enthalten. Umgekehrt vermögen die mit Shiga-Kruse-Bazillen hergestellten agglutinierenden Sera das Endotoxin zu präzipitieren. Jedoch sind nur solche agglutinierenden Sera wirksam, zu deren Herstellung Stämme verwandt wurden, aus denen sich das Endotoxin gewinnen läßt. Mit anderen Worten: das Endotoxin ist identisch mit dem 0-Antigen oder zumindest sein wesentlicher Bestandteil. Dieser Auffassung von Boivin darf man zweifellos beipflichten; wenigstens ist dies die sinnvollste Erklärung für die Tatsache, daß das gut lösliche Endotoxin agglutinierende Antikörper erzeugt, die nur gegenüber den 0-Stämmen wirksam sind. Die Ergebnisse von Boivin werden auch durch Absorptionsversuche gestützt, die Haas ausgeführt hat und die zeigen, daß agglutinierende Sera nach Absättigung mit Endotoxin nicht nur ihr Präzipitationsvermögen, sondern auch ihr Agglutinationsvermögen verlieren, ebenso, daß präzipitierende Sera nach Absättigung mit Vollbakterien nicht nur ihr Agglutinationsvermögen, sondern auch ihr Präzipitationsvermögen verlieren.

Daß die Giftwirkungen von Endotoxinen nur in sehr beschränktem Maße durch die entsprechenden Immunsera aufgehoben werden, ist eine seit langem bekannte Tatsache. Besser ausgedrückt: die mangelhafte Neutralisierbarkeit ist geradezu eine der wesentlichsten Eigenschaften, durch die ein Endotoxin definiert ist. Auch das kohlehydrathaltige Antigen der Shiga-Kruse-Bazillen enthüllt seinen Endotoxincharakter besonders deutlich im Schutzversuch. Zwar lassen sich die Giftwirkungen des Endotoxins bis zu einem gewissen Grade durch präzipitierendes und agglutinierendes Serum aufheben (Boivin), aber stets kann nur eine ganz geringe Zahl von tödlichen Dosen neutralisiert werden. Auch Haas, der die Versuche von Boivin nachgeprüft hat, konnte im günstigsten Falle nur etwa 4 dl entgiften.

Auf ein sehr eigenartiges Verhalten der 0-haltigen und 0-freien Shiga-Kruse-Stämme bin ich durch Herrn Istrati aufmerksam gemacht worden. Die 0-freien Stämme werden durch eine 0,2proz. Trypaflavinlösung in sehr charakteristischer Weise agglutiniert, während Stämme, die das Endotoxin bilden, nur eine ganz geringfügige Agglutination zeigen oder gänzlich inagglutinabel sind. Fräulein Kicksch hat dieses Verhalten an einer Reihe von Shiga-Kruse-Stämmen nachgeprüft und bestätigt. Das Endotoxin scheint also die Shiga-Kruse-Bazillen gegen die Verklumpung durch Trypaflavin zu schützen; wenn sich das Verfahren auch weiterhin bewährt, besitzen wir hier ein rasches und einfaches Mittel zur Unterscheidung der 0- und o-Stämme.

IV.

Während die Frage nach dem Vorkommen eines Endotoxins bei den Shiga-Kruse-Bazillen erst in den letzten Jahren endgültig entschieden worden ist, sind wir über das Verhalten der Flexner-Bazillen bereits seit längerer Zeit unterrichtet. Schon vor 13 Jahren habe ich nachgewiesen, daß die Flexner-Bazillen ein Endotoxin bilden (19). Und zwar ist es mir nicht nur gelungen, ein sogenanntes „Bazillenleibergift" (nach der von Südmersen u. Eagleton für Shiga-Kruse-Bazillen angegebenen Methode) herzustellen, sondern ich konnte durch wäßrige Extraktion der durch Erwärmung auf 58° C abgetoteten Keime auch ein lösliches Endotoxin („Waschwassergift") gewinnen, das bei weißen Mäusen von 15 g Gewicht schon in Dosen von 5 mg eine sicher tödliche Vergiftung erzeugte. Meine Feststellungen sind von de Assis (20) durch aufschlußreiche Beobachtungen über die hohe Teilchengröße des löslichen Flexner-Endotoxins ergänzt worden. Die nach dem Extraktionsverfahren erzielbare Endotoxinausbeute läßt sich erheblich steigern, wenn man die Flexner-Bazillen unter Verzicht auf Erwärmung im Exsikkator bis zur Gewichtskonstanz trocknet und dann mit physiologischer NaCl-Losung oder mit Aqua dest. extrahiert (Prigge, ined.) Auch mit verdünnter Trichloressigsäure läßt sich das Endotoxin aus den Flexner-Bazillen leicht extrahieren (Boivin).

Untersuchungen von Boivin haben ergeben, daß das Flexner-Endotoxin in seinen chemischen Eigenschaften große Aehnlichkeit mit dem Shiga-Kruse-Endotoxin aufweist. Immunbiologisch sind die beiden Gifte selbstverständlich dank ihrer hohen serologischen Spezifität leicht zu trennen. Besonders wichtig ist die Feststellung, daß auch das Flexner-Endotoxin durch 0-agglutinierende Flexner-Sera präzipitiert wird und daß die mit Flexner-Endotoxin hergestellten präzipitierenden Sera Flexner-Stämme. die das 0-Antigen enthalten, spezifisch agglutinieren. Offenbar ist also auch das Flexner-Endotoxin mit dem entsprechenden 0-Antigen identisch (Boivin). Dabei ist zu beachten, daß die Flexner-Endotoxine am schnellsten und stärksten mit den homologen Seren präzipitieren, während die Präzipitation mit einem durch Vorbehandlung mit einem anderen Flexner-Endotoxin gewonnenen Serum nur in niedrigeren Verdünnungen und nur verzögert auftritt (Haas). Dieses Verhalten steht in bester Uebereinstimmung mit der Vorstellung von der Vielheit der Flexner-Rassen, der offenbar eine Vielheit der Flexner-Endotoxine entspricht.

In seinem immunisatorischen Verhalten unterscheidet sich das Flexner-Gift ganz grundsätzlich von einem echten Toxin. Die Wirkung von Flexner-Serum gegenüber Flexner-Gift ist so geringfügig, daß an dem Endotoxincharakter nicht zu zweifeln ist [Prigge (19)]. Boivin und Haas haben etwas wirksamere Sera in Händen gehabt als ich; aber auch diese Autoren konnten nur eine ganz geringe Anzahl von tödlichen Dosen entgiften. —

Untersuchungen über die Giftstoffe der Kruse-Sonne- und der Schmitz-Bazillen hat vor allem Haas durchgeführt. Er hat gezeigt, daß auch diese Keimarten ein charakteristisches Endotoxin enthalten, das in seinen chemischen Eigenschaften dem Endotoxin der Flexner- und der Kruse-Sonne-Bazillen nahesteht. Auch bei den Kruse-Sonne- und bei den Schmitz-Bazillen muß das Endotoxin als identisch mit dem entsprechenden 0-Antigen angesehen werden.

V.

Wir kommen jetzt wieder zum Shiga-Kruse-Bazillus zurück, dem einzigen Ruhrerreger, der neben dem Endotoxin ein echtes Toxin enthält. Dieses Gift ist seit langem gründlich studiert. Es wird durch die antitoxischen Sera auch

in größeren Dosen neutralisiert. Die Abweichungen vom Gesetz der multiplen Proportionen sind hier zwar größer als bei anderen Toxinen; jedoch hat sich gezeigt, daß dieser Umstand lediglich durch den flacheren Verlauf der Neutralisationskurve bedingt ist [Prigge u. Hartoch (21), Lentz u. Prigge (4)].

Während man früher im allgemeinen Filtrate von Bouillonkulturen zu Giftstudien benützte, die meist nur sehr wenig Toxin (höchstens 100 dl in 1 ccm) enthielten, wurden in den letzten Jahren die nach dem Verfahren von Südmersen u. Eagleton (22) hergestellten, „Bazillenleibergifte“ verwandt, die 100 dl in 1 mg und mehr enthalten, also außerordentlich konzentrierte Gifte darstellen.

So wertvoll diese Gifte bei der Herstellung von Impfstoffen zur aktiven Immunisierung (ETA-Impfstoffen, s. S. 17*) sind, bieten sie bei vielen Untersuchungen doch keinen Vorteil. Beim Diphtheriegift habe ich nachgewiesen, daß die Anzahl der durch 1 AE neutralisierten tödlichen Dosen nur gering ist, wenn man an Stelle der flüssigen Toxine die toxinhaltigen Bazillenleiber selbst verwendet; die Leibessubstanz der Diphtheriebazillen bindet ebenso Serum wie das Toxin, sie wirkt also wie ein Toxoid, und es kommt zur Abflachung der Neutralisationskurve, wenn die Wirkung der Bazillenleiber auch eine unspezifische, wahrscheinlich auf Adsorption beruhende ist [Prigge (23)]. Bei den Dysenteriebazillen liegen die Verhältnisse völlig analog. Die Flachheit der Neutralisationskurven dürfte also durch die Verwendung der Bazillenleiber verursacht sein.

Eine wesentliche Erhöhung der Toxinkonzentration in Bouillongiften haben Gildemeister u. Grillo erzielt, indem sie den Bakterien mit Hilfe einer von H. Schmidt-Marburg angegebenen Apparatur eine Nährstoffreserve zur Verfügung stellten; sie gewannen so Gifte, die 1000 dl in 1 ccm und mehr enthielten. Istrati (24) geht so vor, daß er Agarkulturen in physiol. NaCl-Lösung aufschwemmt und — mit etwas Chloroform versetzt — mehrere Wochen bei verschiedenen Temperaturen aufbewahrt. Die so gewonnenen Autolysate enthalten ebenfalls etwa 1000 dl in 1 ccm. Das von Boivin eingeschlagene Verfahren, bei dem das Toxin als Vorprodukt bei der Endotoxingewinnung aus Kulturfiltraten anfällt, habe ich bereits beschrieben. Hochwertige Toxine können ferner durch Zerkleinerung und Extraktion der Bazillenleiber hergestellt werden [Hansen (27)]. Sehr gute Toxinausbeuten habe ich auch erzielt, wenn ich die nach Boivins zweiter Methode mit Trichloressigsäure zur Endotoxindarstellung vorbehandelten Shiga-Kruse-Bazillen nachträglich noch mit Sodalösung bei p_H 9,0 extrahierte. Ich gewann so ebenfalls Gifte mit mehr als 1000 dl/ccm. Das weitaus beste Resultat wird aber erzielt, wenn man 42stünd. Agarkulturen (Drigalski-Schalen) des Shiga-Kruse-Bazillus mit physiologischer NaCl-Lösung abschwemmt und wäscht, die Bazillenleiber ohne vorherige Erwärmung bis zur Gewichtskonstanz über P_2O_5 trocknet, dann mit physiol. NaCl-Lösung (nicht Aqua dest.!) extrahiert und den Extrakt durch eine Kerze filtriert (Prigge, ined.); man erzielt so auf die allereinfachste Weise Gifte, die 2000 bis 10000 dl/ccm enthalten und — was mir als die Hauptsache erscheint — infolge des Fehlens von Bouillonbestandteilen von vornherein einen verhältnismäßig hohen Reinheitsgrad besitzen. Bei sämtlichen Verfahren ist zu berücksichtigen, daß man neben dem Toxin noch mehr oder minder große Mengen von Endotoxin gewinnt, sofern man mit O-Stämmen arbeitet, während die mit o-Stämmen hergestellten Gifte nur Toxin enthalten. Man kann die Anwesenheit des Endotoxins leicht an der charakteristischen Opaleszenz erkennen, die es den Giftlösungen verleiht. Bei Verwendung geeigneter Sera läßt sich das Endotoxin bei einiger Erfahrung auch mit Hilfe der Präzipitationsmethode nachweisen, ohne daß man eine Verwechslung mit der Toxinflockung befürchten müßte, auf die ich noch zu sprechen komme. Soweit sich die Dinge bis jetzt überblicken lassen, darf man sagen, daß sämtliche Shiga-Kruse-Stämme das spezifische Toxin in mehr oder minder großen

Mengen bilden (Boivin, Haas). Es wäre aber ganz verfehlt, in dem Toxin etwa das o-Antigen der endotoxinfreien Stämme erblicken zu wollen. Hierfür fehlt jeder Anhaltspunkt; vielmehr spricht die Tatsache, daß sich bei den Flexner-, Kruse-Sonne- und Schmitz-Bazillen weder in den O- noch in den o-Formen ein Toxin nachweisen läßt, durchaus gegen eine solche Vorstellung.

Dumas, Ramon u. Bilal (25) haben bekanntlich festgestellt, daß das Shiga-Kruse-Toxin durch antitoxisches Serum in charakteristischer Weise ausgeflockt wird, ebenso wie Diphtherietoxin durch das homologe Antitoxin. Auch zur Titration der antitoxischen Ruhrseren haben diese Autoren die Flockungsreaktion benützt, ebenso Halapine, Basilevskaja u. Schitkova (28) und Halapine (30). In den meisten Laboratorien hat das Verfahren aber nicht befriedigt, weil die zur Verfügung stehenden Gifte meist zu schwach waren und weil die Reaktion infolgedessen meist undeutlich und vor allem sehr verspätet auftrat. Istrati (24) hat das Ramonsche Verfahren neuerdings mit hochwertigen Toxinen nachgeprüft und hierbei durchaus befriedigende Resultate erzielt.

Mit Hilfe der Flockungsreaktion ließ sich auch die Frage der Toxoidbildung genauer verfolgen. Daß im Dysenteriegift — ebenso wie im Diphtheriegift — ungiftige, aber antitoxinbindende Stoffe, also sog. „Toxoidmodifikationen" in wechselnder Menge vorhanden sind, haben Schlossberger u. Hartoch (26) mit Hilfe des Tierversuches bereits im Jahre 1925 festgestellt. Es hat sich nun gezeigt, daß der Toxingehalt frischer Giftlösungen verhältnismäßig rasch abnimmt, während die Anzahl an Flockungseinheiten nahezu konstant bleibt (Prigge, ined.). In einem extremen Falle konnte ich feststellen, daß ein Gift, welches unmittelbar nach der Gewinnung 5000 dl und 132 Lf (Flockungseinheiten) in 1 ccm enthielt, schon nach 1 Woche nur 1000 dl, dagegen noch 125 Lf enthielt. Der Toxingehalt hatte also um 80 Proz. abgenommen, während die gesamte Antigenmenge (Toxin plus Toxoid) innerhalb der Fehlergrenzen der Meßmethode die gleiche geblieben war. Dieses Verhalten spricht eindeutig für eine Umwandlung von Toxin in Toxoid. Die Abschwächung scheint in den durch Extraktion getrockneter Bazillen gewonnenen Toxinlösungen vielfach wesentlich schneller vor sich zu gehen als in Bouillongiften. Soweit ich die Verhältnisse bis jetzt überschauen kann, entfallen auf 1 Lf höchstens 40 dl (bei ganz frischen Giften). Anscheinend ergibt sich hier der gleiche Maximalwert, wie er auch beim Diphtherietoxin gefunden wird: 1 Lf = 40 dl_{100} (Prigge u. Klinkhart, ined.); die Uebereinstimmung ist natürlich ganz zufällig, da die der Bestimmung des Lf-Wertes zugrundeliegende Antitoxineinheit willkürlich gewählt ist und da die Angabe der dl sich beim Shiga-Kruse-Gift auf Mäuse, beim Diphtheriegift auf Meerschweinchen bezieht.

Bei Diphtheriegiften wird die Toxoidbildung durch Formol bekanntlich stark begünstigt. Ganz anders liegen die Verhältnisse beim Dysenterietoxin. Zwar wird durch Formol auch hier eine Entgiftung erzielt; aber gleichzeitig mit der Toxizität wird auch das Immunisierungsvermögen zerstört. Unter der Einwirkung von Formaldehyd kommt es also nicht zu einer Umwandlung von Toxin in Toxoid, sondern zu einer Zerstörung des gesamten Toxinkomplexes [Prigge (16)]. Hierin ist ein wesentlicher Unterschied zwischen Diphtherie- und Dysenterietoxin zu erblicken; das letztere scheint noch labiler zu sein als das erstere.

Allerdings ist hier eine Einschränkung zu machen. Nachgewiesen ist bisher nur, daß formolisierte Dysenterietoxine nicht mehr immunisierend wirken, wenn sie völlig entgiftet sind. Es wäre doch immerhin denkbar, daß unter der Formolwirkung Toxoide entstehen, welche noch Antitoxin binden, aber keine antigene Wirksamkeit mehr besitzen. Mit Hilfe der Flockungsreaktion wird sich unschwer entscheiden lassen, wie die Verhältnisse liegen.

Ueber die chemischen Eigenschaften des Dysenterietoxins ist bisher nur wenig bekannt; die bisherigen Untersucher sind sich lediglich darüber einig, daß es sich um einen Körper von Proteincharakter handelt. Eingehende Untersuchungen über die Natur des Shiga-Kruse-Toxins, zu denen ich durch meine Arbeiten über ETA-Impfstoffe (s. S. 17*) geführt wurde und die ich gemeinsam mit Herrn Wagner-Jauregg, Fräulein Kicksch und Fräulein Helmert durchführe, haben aber jetzt einige weitere Erkenntnisse ermöglicht. Herr Wagner-Jauregg wird auch über diesen Teil unserer Untersuchungen nachher berichten. Besonders erwähnen möchte ich in diesem Zusammenhang noch eine schöne, viel zu wenig beachtete Arbeit von Wichmann (56), die den Nachweis erbracht hat, daß man Shiga-Kruse-Gift auch auf rein synthetischen Nährböden gewinnen kann. Man kann mit der Wichmannschen Methode Giftlösungen gewinnen, in denen die für chemische Untersuchungen so störenden Peptone und andere unspezifischen hochmolekularen Verbindungen von vornherein fehlen. Der einzige Nachteil des Verfahrens ist darin zu erblicken, daß die Giftkonzentration in den Wichmannschen Lösungen zu gering ist, um chemische Untersuchungen zu ermöglichen. Die große theoretische Bedeutung dieser Arbeit wird aber hierdurch nicht geschmälert. Es sei noch darauf hingewiesen, daß sie 10 Jahre vor den entsprechenden amerikanischen Untersuchungen über Diphtheriegift (Pappenheimer) durchgeführt worden ist, die heute so große Aufmerksamkeit finden.

Neben dem Toxin und dem Endotoxin sind von verschiedenen Autoren noch andere Giftstoffe der Shiga-Kruse-Bazillen beschrieben worden [Olitzky u. Leibowitz (33)], Olitzky u. Avineri (34), Olitzky, Leibowitz u. Berman (35), Halapine (30), Halapine, Basilevskaja u. Schitkowa (36), Haas (12)]. Alle diese Feststellungen scheinen mir neben den gesicherten Ergebnissen, über die ich berichtet habe, als mehr oder weniger hypothetisch. Das gilt anscheinend auch für einen dritten Giftstoff, den Boivin neben Toxin und Endotoxin in Shiga-Kruse-Bazillen nachgewiesen zu haben glaubt; es soll sich um ein hitzebeständiges Gift handeln, dessen Wirkungen durch Trypsinverdauung aufgehoben werden, also um einen thermostabilen (!) Proteinkorper. Auch Istrati (persönliche Mitteilung) glaubt, diesen Körper in Händen gehabt zu haben. Die Untersuchungen, die ich mit Herrn Wagner-Jauregg durchführe, haben aber bisher keinerlei Anhaltspunkte für die tatsächliche Existenz dieses Stoffes geliefert.

VI.

Ueber die pathogenetische Bedeutung der beiden Shiga-Kruse-Gifte ist bisher leider mehr diskutiert als experimentiert worden. In der Hauptsache sind Untersuchungen an der Maus angestellt worden, also an einem für die Entscheidung pathologisch-anatomischer Fragen gänzlich ungeeigneten Versuchstier. Auch Versuche an Kaninchen und Meerschweinchen sind angestellt worden, dagegen noch gar nicht (soviel ich weiß) an Affen. Ich darf mich daher hier kurz fassen.

Kruse, Selter, Pfeiffer u. Ungermann und Bessau haben von jeher die Ansicht vertreten, daß das neurotrope Toxin bei der Shiga-Kruse-Ruhr keine wesentliche Rolle spiele, weil beim ruhrkranken Menschen die Lähmungserscheinungen fehlen, die das Toxin beim Kaninchen und bei der Maus erzeugt [zusammenfassende Darstellung s. bei Lentz u. Prigge (4) in den Abschnitten über „Tierpathogenität der Ruhrbazillen" und über „Toxine"]. Nach ihrer Auffassung ist lediglich das enterotrope Endotoxin von maßgebender Bedeutung; nach Kruse ruft das Endotoxin auch die große Schwäche und Abmagerung hervor. Kraus u. Dörr machen dagegen gerade das Toxin für die schwere Prostration und die heftigen nervösen Erscheinungen verantwortlich, wie sie bei der Shiga-Kruse-Ruhr so häufig beobachtet werden. Es sei in diesem Zusammenhang besonders auf die interessanten Feststellungen hin-

gewiesen, die Dörr u. Seidenberg (37) nach Injektion von Shiga-Kruse-Toxin in das Zentralnervensystem von Kaninchen machen konnten (starkes Auftreten der Paresen!).

Gegenüber den älteren Untersuchungen besitzen die Feststellungen von Boivin den Vorteil, daß sie mit verhältnismäßig einheitlichen Giftlösungen durchgeführt worden sind, in denen entweder nur das Toxin oder nur das Endotoxin enthalten war; dem steht der Nachteil gegenüber, daß Boivin nur an Mäusen gearbeitet hat. Aus Boivins Feststellungen, deren Richtigkeit ich vollauf bestätigen kann und die auch von Haas als richtig erklärt worden sind, geht hervor, daß das Endotoxin verhältnismäßig akut wirkt. Die Tiere sterben entweder innerhalb von 1—2, höchstens 3 Tagen, oder sie werden gesund. Lähmungen treten nie auf; es kommt aber zu Diarrhöen. Bei der Sektion erweisen sich die Gefäße aller Darmpartien als stark injiziert. Das Toxin wirkt viel langsamer. Die Krankheitserscheinungen setzen nur bei extrem hohen Dosen vor dem 2. Tage ein. Es kommt zu charakteristischen Lähmungen der Extremitäten, vor allem der Hinterbeine. Die Lähmungen gelangen nicht immer zur Beobachtung, weil sie vielfach nur kurze Zeit anhalten und rasch zum Tode führen; man muß das Verhalten der Tiere also sehr aufmerksam verfolgen. Immerhin bleiben bei manchen Tieren die Lähmungen tagelang in vollster Schwere ausgeprägt. Der Tod tritt bei mittleren Dosen häufig am 3. und 4. Tage ein, doch sterben einzelne Tiere auch schon früher, manche später, bisweilen erst nach 8 Tagen oder noch später. Tiere, die innerhalb von 10 Tagen nicht gestorben sind, erholen sich in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle wieder ganz. In der Literatur wird m. W. nirgends auf die oft sehr ausgesprochene Rötung der Nebennieren hingewiesen, die man bei akut gestorbenen Mäusen beobachten kann. Ich möchte in diesem Zusammenhang daher besonders auf die Nebennierenveränderungen hinweisen, die Remlinger u. Dumas (38) bei akuter Ruhr des Menschen beschrieben haben.

Was für Folgerungen dürfen aus den Ergebnissen der bisher durchgeführten Tierversuche für die Pathogenese der Ruhr des Menschen gezogen werden? streng genommen: gar keine! Sie ermöglichen lediglich die Aufstellung einer Arbeitshypothese, die ich folgendermaßen formulieren möchte:

Das Endotoxin verursacht die Darmerscheinungen. Diese Auffassung deckt sich vollauf mit der Ansicht aller älteren Untersucher. Das Toxin ist dagegen als Ursache der Allgemeinvergiftung und der nervösen Erscheinungen anzusehen, die wir bei schweren Fällen von Shiga-Kruse-Ruhr beobachten. Da die Sera, die bisher in den Handel kamen, vor allem durch einen hohen Gehalt an Anti-„Toxin“ gekennzeichnet sind, werden die Kliniker am ehesten imstande sein, auf Grund ihrer Erfahrungen über die Wirkungen dieser Sera ein Urteil über die pathogenetische Bedeutung des Toxins abzugeben.

Gegen die Richtigkeit der erwähnten Arbeitshypothese hat Istrati (39) auf Grund von Versuchen am Kaninchen Einwände erhoben. Er hat nach Injektion von Toxinlösungen schwere Veränderungen im Intestinaltraktus beobachtet, die vorwiegend im Zökum lokalisiert waren; es handelt sich hier anscheinend um die gleichen Wirkungen, wie sie Horimi (40) schon vor dem Kriege beschrieben und durch ein „Blinddarmgift“ erklärt hat. Istrati hat seine Arbeiten aber nicht mit gereinigten Toxinlösungen durchgeführt, sondern mit Autolysaten von o-Stämmen, so daß sich nur schwer beurteilen läßt, wie die von ihm beobachteten Wirkungen zustande gekommen sind. Auf Grund der Fortschritte, die bei der Isolierung der Gifte des Shiga-Kruse-Bazillus erzielt sind, ist zu fordern, daß Untersuchungen über die Pathogenese der Ruhr künftig nur mit möglichst weit gereinigten Präparaten vorgenommen werden, sofern es darauf ankommt, die Wirkungen der einzelnen Giftfraktionen richtig ein zuschätzen. Nur auf diesem Wege lassen sich eindeutige Resultate erzielen.

Istrati (39) weist auch auf das Mengenverhältnis von Toxin und Endotoxin hin, das nach seiner Auffassung zuungunsten der ätiologischen Bedeutung des Endotoxins spricht. Bei meinen eigenen Untersuchungen konnte ich aus 100 mg 0-Bakterien im allgemeinen 1000—2500 tödliche Dosen Toxin und (durch nachträgliche Extraktion mit Trichloressigsäure) etwa 5—6 tödliche Dosen Endotoxin gewinnen; auch in der Toxinfraktion dürften noch etwa 5—6 tödliche Dosen Endotoxin enthalten sein. Es kommen also auf 1000 Einheiten Toxin allerhöchstens 12 Einheiten Endotoxin bzw. auf 1 Einheit Toxin nur etwa $^1/_{100}$ Einheit Endotoxin, wenn man die Giftwirkungen der gesamten Bakterienzelle kalkuliert. Ich halte es aber nicht für zulassig, aus solchen Berechnungen irgendwelche Schlüsse auf die pathogenetische Bedeutung der verschiedenen Partialgifte zu ziehen. Es mag einstweilen dahingestellt bleiben, woran der Ruhrkranke stirbt. Die Frage, die es vorerst zu entscheiden gilt, ist eine ganz andere; es handelt sich um die Frage, welche Noxe die Darmerscheinungen und welche Noxe die Vergiftungserscheinungen bedingt; und diese Frage läßt sich nicht auf Grund von Messungsergebnissen an Mäusen beurteilen, bei denen das Gift gar nicht in den Darm gelangt, sondern sofort in die Blutbahn eingebracht wird. Die letale Bedeutung der einzelnen Faktoren steht auf einem anderen Blatt. Fürs Erste kommt es jetzt darauf an, eingehende pathologisch-anatomischen Untersuchungen anzustellen, für deren Durchführung zwei Forderungen gestellt werden müssen:

a) Verwendung moglichst reiner Gifte;
b) Verwendung von Versuchstieren, deren Bedeutung sich nicht auf die Eignung zur Vornahme von biologischen Messungen beschränkt (Mäuse usw.), sondern die auch den Zwecken der vergleichenden Pathologie genügen (Affen).

Sehr viel einfacher als bei der Shiga-Kruse-Ruhr liegen die Verhältnisse bei den anderen Ruhrarten. Sowohl bei den Flexner-Bazillen als auch bei den Kruse-Sonne- und den Schmitz-Bazillen kennen wir nur eine Giftart, das Endotoxin. Auch bei den durch diese Keime verursachten Erkrankungen kommt es zu schweren Darmveränderungen. Wir haben keinen Grund an der pathogenetischen Bedeutung der verschiedenen Endotoxine zu zweifeln. Immerhin möchte ich darauf hinweisen, daß es sich auch hier vorerst nur um eine Arbeitshypothese handelt, die sich mit den für die Shiga-Kruse-Ruhr entwickelten Vorstellungen gut vereinigen läßt.

VII.

Auch die Frage der aktiven Immunisierung hat in den letzten Jahren wieder erhöhte Aufmerksamkeit gefunden. Bei der Shiga-Kruse-Ruhr handelt es sich vor allem darum, neben der antitoxischen auch eine anti-endotoxische Immunität zu erzeugen. Dieser Gesichtspunkt hat mich zur Entwicklung von sog. ETA-(Endotoxin-Toxin-Antitoxin-) bzw. ET-(Endotoxin-Toxin-) Impfstoffen veranlaßt [s. Prigge (16, 41)]. Da ich vor unserer Vereinigung erst vor 1½ Jahren ausführlich über diese Frage berichtet habe, kann ich mich heute kurz fassen. Durch die gütige Mitwirkung der Herren Sütterlin und Sylvester ist es inzwischen möglich geworden, eine größere Anzahl von Personen mit ETA- und ET-Impfstoffen zu immunisieren und den Erfolg der Impfung bei ihnen zu prüfen. Ein ganz sicheres Urteil über die Wirkung der Impfstoffe ist in epidemiefreien Zeiten selbstverständlich nicht möglich. Man muß sich also darauf beschränken, die Resultate auf Grund von Serumuntersuchungen bei den geimpften Personen zu beurteilen. Die Auswertung der Sera hat in zweifacher Richtung zu erfolgen:

a) auf ihren Gehalt an Anti-Toxin,
b) auf ihren Gehalt an Anti-Endotoxin.

Die Messung des Antitoxin-Gehaltes der Patientensera macht keinerlei besondere Schwierigkeiten. Dagegen lassen sich die anti-endotoxischen Wirkungen der Sera noch nicht befriedigend beurteilen. Wenn wir auch annehmen dürfen, daß die Agglutinine und Präzipitine von den anti-endotoxischen Schutzstoffen nicht verschieden sind, kann doch nur der eigentliche Schutzversuch ein brauchbares Kriterium darstellen. Da ich eine befriedigende

Methodik hierfür noch nicht entwickeln konnte, beschränke ich mich für heute darauf, eine Uebersicht über die mit den ETA-Impfstoffen erreichte Wirkung auf den Antitoxin-Spiegel in tabellarischer Form zu geben. Zu den Untersuchungen, die ich gemeinsam mit Fräulein Klinkhart durchgeführt habe, standen mir Seren von 80 Personen zur Verfügung. Bei allen wurde unmittelbar vor der ersten Impfung Blut entnommen. Bei 11 Personen wurde die zweite Blutentnahme erst 10 Monate nach der letzten Impfung vorgenommen. Von den übrigen 69, bei denen das für die zweite Titration erforderliche Blut stets 4 Wochen nach der letzten Impfung abgenommen wurde, hatten 4 bereits vor der Impfung einen gewissen Antitoxintiter (0,125 bis 0,5 AE/ccm), während bei den 65 anderen vor der Immunisierung kein Antitoxin im Serum nachgewiesen werden konnte (stets < 0,125 AE/ccm). Ueber das bei diesen 65 Personen gewonnene Ergebnis berichtet Tabelle VI. Wie Sie sehen, ist es bei 32 von 44 dreimal geimpften Personen zu einer deutlichen Antitoxinbildung gekommen; und zwar betrug der Mittelwert des gebildeten Antitoxins etwa 1 AE/ccm.

Tabelle VI.
Antitoxintiter des Serums 4 Wochen nach der Impfung mit Shiga-Kruse-ETA-Impfstoff.

Dosis	Zahl der geimpften Personen	Zahl der Personen mit einem Antitoxingehalt (AE/ccm) von							
		<0,125	0,125 bis 0,25 [1])	0,25 bis 0,5	0,5 bis 1,0	1,0 bis 2,0	2,0 bis 5,0	5,0 bis 10,0	10,0 bis 20,0
1mal 0,1 ccm	5	4	1						
0,2 „	2	2							
0,3 „	5	4	1						
0,5 „	4	3	1						
1,0 „	1	1							
2mal 0,2 ccm	4	1		2		1			
3mal 0,2 ccm	44	12	3	2	8	8	6	3	2

1) 0,25, 0,5 usw. bedeutet, daß der betreffende Wert bereits zur nächsthöheren Klasse gehort.

Trotz diesen Ergebnissen ist das Problem der aktiven Immunisierung gegen Shiga-Kruse-Ruhr von einer befriedigenden Lösung noch weit entfernt. Vor allem sind die Nebenwirkungen, die sich bei der subkutanen Impfung zeigen, noch immer groß. Ich rechne aber damit, daß die ETA- und ET-Impfstoffe, die jetzt zur Prüfung gelangen, auch hierin einen Fortschritt bringen werden. Besonders erwähnenswert scheint mir, daß Moore u. Kersten (46) in Amerika angeblich völlig atoxische und hochwirksame Impfstoffe durch Abtötung von Shiga-Kruse-Kulturen mit Röntgenstrahlen gewonnen haben wollen. Ob sich die subkutane Methode auf die Dauer durchzusetzen vermag, scheint mir freilich überhaupt noch nicht entschieden zu sein. Nach den günstigen Erfahrungen, die in Frankreich, Griechenland, Jugoslawien und Rußland [Alivisatos (42), Radoytchitch (43), Kortschak-Tschepurkowskaja (44), Kornjuschenko (45)] mit der oralen Ruhrschutzimpfung gemacht worden sind, darf man vielleicht darauf hoffen, daß eine parenterale Einverleibung der Impfstoffe in Zukunft ganz überflüssig wird. Untersuchungen über die Frage der stomachalen Impfung werden in Deutschland zur Zeit mit Impfstoffen durchgeführt, die Herr Konrich hergestellt hat; ihr Ergebnis wird voraussichtlich die Frage nach

der besten Applikationsmethode der Antigene zur endgültigen Klärung bringen. —

Wesentlich leichter als gegen Shiga-Kruse-Bazillen läßt sich nach neueren Berichten anscheinend eine Immunität gegen die übrigen Ruhrerreger erzeugen. Hier sind vor allem die erst vor kurzem veröffentlichten Ergebnisse von Otto (47) zu erwähnen. Die auf Ottos Veranlassung durchgeführte subkutane Applikation eines polyvalenten Flexner-Impfstoffes konnte im Jahre 1917 auf einem mit 3500 Mann belegten Truppenübungsplatz eine Ruhr-Epidemie bzw. -Endemie zum Erlöschen bringen; die Erfolge sind deshalb besonders beweiskräftig, weil die Erkrankungen bei den anderwärtig untergebrachten nichtgeimpften Teilen der in Betracht kommenden Truppenkörper und in der Umgebung des Truppenübungsplatzes auch weiterhin in sehr großer Zahl auftraten und sogar eine Reihe von Todesopfern forderten. Mit Rücksicht auf die epidemiologischen Untersuchungen von Häßler (48) und Sartorius (49) muß man fordern, daß die Impfstoffe neben Keimen der Rassen A, D und H auch solche der Rasse F (Schmitz I ?) und der englischen Rasse X enthalten. Da Rodenwald (50) sowie Ernst u. Trappmann (62) ferner über gute Erfolge der Vakzination gegen E-Ruhr berichtet haben, wird man die polyvalenten Impfstoffe noch durch Kruse-Sonne-Bakterien zu ergänzen oder die Bereitstellung besonderer Präparate zur Immunisierung gegen Kruse-Sonne-Ruhr zu erwägen haben. —

Auf dem Gebiete der Serumtherapie der Shiga-Kruse-Ruhr sind prinzipielle Fortschritte nicht erzielt worden. Immerhin ist beachtenswert, daß die Serumfabriken an Stelle von 200fachen Seren jetzt meist Präparate mit 400 oder gar 1000 AE/ccm abgeben. Die neueren Ergebnisse, die bei der Antigenanalyse gewonnen worden sind, führen für die Gewinnung der antitoxischen Sera zu zwei Forderungen, die bisher nicht erfüllt sind:

a) die Wertbemessung des Antitoxingehaltes der Shiga-Kruse-Sera muß in Zukunft mit möglichst reinen Toxinpräparaten durchgeführt werden, nicht mehr, wie bisher, mit Giften, die neben dem Toxin gewisse Mengen von Endotoxin enthalten;

b) da der Gehalt der Sera an Anti-Endotoxin wahrscheinlich nicht ohne Bedeutung für den Heilwert der Präparate ist, wird man sich künftig auch um eine Messung des antiendotoxischen Titers der Präparate zu bemühen haben und wird nach Möglichkeit eine Anreicherung der antiendotoxischen Stoffe anstreben müssen. Auch einer Serumtherapie der Flexner-, Kruse-Sonne- und Schmitz-Ruhr werden sich hierdurch vielleicht neue Wege öffnen.

Die Serumprophylaxe hat stets nur eine geringe Rolle gespielt; doch berichtete Negenborn (57) jüngst über eine Ruhrepidemie auf einem Auslandskreuzer, die nach passiver Immunisierung mit Ruhrserum zum Erlöschen kam. —

Im Anschluß an die Erörterung der immunbiologischen Probleme darf ich vielleicht noch erwähnen, daß auch die Therapie und die Prophylaxe mit Bakteriophagen verschiedentlich in neuerer Zeit wieder empfohlen worden ist [Suknew (51), Weinberg (52)]. Schließlich sei noch darauf hingewiesen, daß Jötten u. Holtmann (53) den Versuch unternommen haben, eine Chemotherapie der Ruhr mit Silber-Oxybenzyliden-Verbindungen zu entwickeln.

VIII.

Die epidemiologische Erforschung der Ruhr darf seit langem als abgeschlossen gelten. Es kann sich hier nur darum handeln, diese oder jene

Einzelheit zu klären. Ich bitte Sie, mir in diesem Zusammenhang vorerst noch einige Bemerkungen über die Tierpathogenität der Ruhrbazillen zu gestatten. Es galt lange als Dogma, daß die Dysenterie eine ganz auf den Menschen beschränkte Erkrankung sei. Diese Auffassung ist nicht uneingeschränkt richtig. Ich erinnere Sie daran, daß schon Kruse bei spontan erkrankten Rhesusaffen Ruhrbazillen gefunden hat. Ferner hat Firth bei Rhesusaffen durch Verfüttern von Shiga-Kruse-Bazillen echte Dysenterie erzeugt, ebenso Bernhardt u. Markoff mit Flexner-Bazillen, schließlich Sonne mit Kruse-Sonne-Bazillen. Und vor wenigen Jahren hat Fenigstein (54) gradezu eine Ruhrepidemie unter den Rhesusaffen des zoologischen Gartens in Warschau beschrieben; die Epidemie war durch Flexner-Bazillen hervorgerufen, die zu den englischen Rassen Y und Z, also zu den deutschen Rassen D und H gehörten. Alle diese Feststellungen scheinen mir deshalb so überaus wichtig zu sein, weil bisher keine wirklich brauchbaren Untersuchungen über die pathogenetische Bedeutung der Ruhr-Toxine und -Endotoxine vorliegen.

Eine eigentlich epidemiologische Bedeutung hat man bisher wohl nur den Fliegen zugeschrieben. Sie kennen ja alle das Wort von dem „fly-borne disease". Immerhin ist es auch ganz wissenswert, daß Shibata u. Tashiro es fertig gebracht haben, Hausratten mit Ruhrbazillen zu infizieren. Die Tiere erkrankten selbstverständlich nicht; sie schieden die Keime aber in lebensfähigem Zustande wieder aus; die Ruhrbazillen wurden noch nach 60 Tagen in der Außenwelt nachgewiesen. —

Man hört im allgemeinen die Ansicht, die Shiga-Kruse-Ruhr sei im Verschwinden begriffen. Dieser Auffassung kann ich mich nicht anschließen. Zwar tritt die Shiga-Kruse-Ruhr zeitweilig gegenüber den anderen Ruhrarten in den Hintergrund. Aber sie spielt immer eine wichtige Rolle, auch in Deutschland: über eine Shiga-Kruse-Epidemie in Mecklenburg wird uns Herr Kollath noch berichten. Die Verhältnisse sind freilich von Land zu Land — und höchstwahrscheinlich zu verschiedenen Zeiten — sehr verschieden. So teilt zwar de Haas (58) mit, daß die Shiga-Kruse-Ruhr in Niederländisch-Indien nur 5 Proz. aller Fälle ausmacht, allerdings bei 50 Proz. Letalität; ähnliches wird aus Japan berichtet [Miayo (59)]. Aus Südkorea, sowie aus der südlichen Mandschurei und aus Formosa hören wir dagegen vorwiegend von Shiga-Kruse-Fällen (Miayo). Auch auf den Philippinen kommen alljährlich Shiga-Kruse-Epidemien vor [Eubanas (60)].

Die große Bedeutung der Kruse-Sonne-Ruhr wird durch diese Feststellungen nicht geschmälert. Es sei vor allem auf die Feststellungen von Häßler (48) hingewiesen, wonach die Kinderdysenterie in Deutschland vor allem durch Kruse-Sonne-Bazillen verursacht wird. Aehnliche Feststellungen haben Schuberth (61) sowie Ernst u. Trappmann (62) gemacht. Aber auch Flexner-Fälle sind nicht ganz selten, vor allem solche, die durch die Rassen A, D und H verursacht werden, daneben solche, die auf die Rasse F (Schmitz I ?) und auf die englische Rasse X zurückgehen [Sartorius u. Frese (49), Häßler (48)]. Auch die von Häßler als D_2 bezeichneten Stämme sind nach den Untersuchungen von Sartorius u. Frese (49) nichts anderes als D- und F-Stämme. —

Zum Schluß möchte ich Ihnen noch einige interessante statistische Angaben machen. Tabelle VII gibt Ihnen einen Ueberblick über den Verlauf der Ruhr während der letzten 7 Jahre in Deutschland. Die Ruhr hat hiernach in jüngster Zeit etwas zugenommen.

Tabelle VII.
Erkrankungshäufigkeit und Sterblichkeit an Ruhr in Deutschland von 1932—1938.

	Erkrankungen	Todesfalle
1932	4865	126
1933	2525	122
1934	3301	142
1935	3275	134
1936	4816	124
1937	7545	181
1938	5265	161

Tabelle VIII A bringt einen vergleichenden Ueberblick über den Verlauf der Ruhr in 3 besonders wichtigen Ländern während des Jahres 1937.

Tabelle VIII A.
Ruhrerkrankungen in Deutschland, Italien und England während des Jahres 1937.

	Deutschland	Italien	England (mit Wales)
1. Quartal	384	90	336
2. „	2859	222	306
3. „	**3137**	**1249**	532
4. „	1165	493	**2892**

Tabelle VIII A bestätigt die alte Regel, daß die Ruhr in unseren Breiten vor allem im Hochsommer und im Herbst vorkommt; sie zeigt aber anscheinend, daß diese Regel für England nicht gilt. Da ich prüfen wollte, ob es sich hier um ein zufälliges oder um ein allgemeingültiges Ergebnis handelte, habe ich die englischen Zahlen für einige Jahre zusammengestellt. Aus Tabelle VIII B ersehen Sie in der Tat, daß die Erkrankungskurve in England ihren Gipfel später hat als bei uns und in Italien. Es wäre interessant, etwas Näheres über die Ursachen zu erfahren, auf welche diese Verschiebung zurückzuführen ist. Vielleicht könnten genauere Statistiken aus dem Rhein-Ruhrgebiet zu einer Klärung verhelfen.

Tabelle VIII B.
Ruhrerkrankungen in England (mit Wales) 1934—1937.

	1934	1935	1936	1937
1. Quartal	*235*	*270*	**516**	336
2. „	120	213	270	306
3. „	?	224	235	*532*
4. „	**238**	**431**	*323*	**2892**

Schrifttum.

1) Kruse, W., Ritterhaus, Kemp u. Metz, Z. Hyg. **57**, 417 (1907). — 2) Braun, H., Z. klin. Med. **91**, 304 (1919). — 3) Andrewes, F. W., u. Inman, A. C., Med. Research Committee, Spec. Report series Nr 42 (1919). — 4) Lentz, O., u. Prigge, R., Handb. d. pathog. Mikroorg., 3. Aufl., Bd. 3, S. 1377 ff. — 5) Ornstein, M., Z. Hyg. **91**, 52 (1920). — 6) Smith, T., u. Reagh, A. L., J. of med. Res. **10**, 89 (1903). — 7) Beyer, H. G., u. Reagh, A. L., J. of med. Res. **12**, 313 (1904). — 8) Andrewes, F. W., J. of Path. **25**, 505 (1922). — 9) Kauffmann, F., u. Mitsui, C., Z. Hyg. **111**, 740 (1937). — 10) Arkwright, J. A., J. of Path. **24**, 36 (1921). — 11) White, P. B., Medical research council, Special report

series Nr 103 (1926). — 12) Haas, R., Z. Immun.forschg **91**, 254 (1937); **92**, 355; **94**, 239 u. 480 (1938). — 13) Boivin, A., u. Mesrobeanu, L., Premier Congrès des Microbiologistes de Langue française, à Paris, 27. 10. 1938. Paris, Anc. imp. de la Cour d'Appel — 46632. — 14) Sartorius, F., u. Reploh, H., Zbl. Bakter. I Orig. **126**, 10 (1932). — 15) Okell, C. C., u. Blake, A. V., J. of Path. **33**, 57 (1930). — 16) Prigge, R., Zbl. Bakter. I Orig. **140**, 230* (1937). — 17) Raistrick, H., u. Topley, L. L. C., Brit. J. exper. Path. **15**, 2 u. 113 (1934). — 18) Morgan, W. Th. J., Biochemic. J. **31**, 2003 (1937). — 19) Prigge, R., Z. Hyg. **105**, 488 (1926). — 20) de Assis, A., Z. Immun.forschg **58**, 343 (1928). — 21) Prigge, R., u. Hartoch, O., Arb. Inst. exper. Ther. Frankf. **23**, 1 (1930). — 22) Südmersen, H. J., u. Eagleton, A. J., Lancet **1921**, 1109. — 23) Prigge, R., Z. Immun.forschg **77**, 421 (1933). — 24) Istrati, G., Z. Immun.forschg **94**, 264 (1938). — 25) Dumas, J., Ramon, G., u. Bilal, S., Ann. Inst. Pasteur **40**, 134 (1926). — 26) Takita, J., J. of Hyg. **37**, 271 (1937). — 27) Hansen, A., Biochem. Z. **287**, 35 (1936). — 28) Halapine, K., Basilevskaja, L., u. Schitkova, N., Ann. Inst. Pasteur **58**, 154 (1937). — 29) Morzycki, J., u. Zablocki, B., Med. dóswiadcz. i. społ. **20**, 518 u. 529 (1936). — 30) Halapine, K., Ann. Inst. Pasteur **58**, 599 (1937). — 31) Miller, A. A., Ann. Inst. Pasteur **58**, 709 (1937). — 32) Morgan, W. Th. J., Helvet. chim. Acta **21**, 469 (1938). — 33) Olitsky, L., u. Leibowitz, J., Brit. J. exper. Path. **16**, 523 (1935). — 34) Olitsky, L., u. Avinery, Sh., Ebenda **18**, 316 (1937). — 35) Olitsky, L., Leibowitz, J., u. Bermann, M., Ebenda **18**, 305 (1937). — 36) Halapine, K., Basilevskaja, L., u. Schitkova, N., Ann. Inst. Pasteur **58**, 341 (1937). — 37) Dorr, R., u. Seidenberg, S., Z. Hyg. **119**, 72 (1936). — 38) Remlinger, P., u. Dumas, J., C. r. Soc. Biol. **78**, 433 (1915). — 39) Istrati, G., C. r. Soc. Biol. **129**, 1010 (1938). — 40) Horimi, K., Zbl. Bakter. I Orig. **68**, 342 (1913). — 41) Prigge, R., Dtsch. med. Wschr. **1939**, Nr 2, 56. — 42) Alivisatos, G. P., Immunität, Allergie und Infektionskrankheiten **2**, 37 (1929). — 43) Radoytchitch, M., Bull. mens. Off. int. d'Hyg. publ. **27**, 2180 (1935). — 44) Kortschak-Tschepurkowskaja, N., u. Wolkowa, N., Mikrobiol. Z. (russ.) **15**, 238 (1935). — 45) Kornjuschenko, N., Denisow, N., u. Michalewski, N., Mikrobiol. Z. (russ.) **17**, 376 (1936). — 46) Moore, H. N., u. Kersten, H., J. Bacter. **31**, 581 (1936). — 47) Otto, R., Zbl. Bakter. I Orig. **140**, 237* (1937). — 48) Häßler, E., Die giftarmen Ruhrbazillen. Berlin, S. Karger, 1935. — 49) Sartorius, F., u. Frese, M., Zbl. Bakter. I Orig. **138**, 189 (1937). — 50) Rodenwaldt, E., Zbl. Bakter. I Orig. **140**, 236* (1937). — 51) Suknew, W., Ulissko, A., u. Michajlow, S., Mikrobiol. (russ.) **17**, 915 (1936). — 52) Weinberg, B., Schultz, N., Feldstein, R., Daschko, U., u. Mechkovskaja, L., Mikrobiol. Z. (russ.) **3**, 135 (1936). — 53) Jotten, K. W., u. Holtmann, G., Dtsch. med. Wschr. **1937**, 714. — 54) Fenigstein, L., Med. dóswiadcz. i. społ. **19**, 345 (1935). — 55) Shibata, T., u. Tashiro, K., Bull. nav. med. Assoc. **25**, 20 (1936). — 56) Wichmann, F. W., Arb. Inst. exper. Ther. Frankf. **21**, 362 (1928). — 57) Negenborn, P., Dtsch. Militärarzt **3**, 141 (1938). — 58) de Haas, J. H., Geneesk. Tijdschr. Niederl.-Ind. **1937**, 1785. — 59) Miayo, J., Bull. nav. med. Assoc. Tokyo **26**, 59 (1937). — 60) Eubanas, Fr., Monthly Bull. Bur. Health **16**, 301 (1936). — 61) Schuberth, A., Vorkommen und Zunahme von E-Ruhr. Jena 1936 (Diss.). — 62) Ernst, W., u. Trappmann, K., Oeff. Gesdh.dienst **3**, A 618 (1937). — 63) Clauberg, K. W., Zbl. Bakter. I Orig. **124**, 23 (1932). — 64) Clauberg, K. W., Zbl. Bakter. I Orig. **128**, 269 (1933). — 65) Kalic, D., J. of Path. **30**, 593 (1927). — 66) Sartorius, F., u. Stoeckel, K. H., Z. Immun.forschg **90**, 235 (1937).

Sammelbericht II. Josef Siegl[1]) (Wien):

Zur Klinik und spezifischen Therapie der bazillären Ruhr[2]).

Wenn man sich aus dem Schrifttum ein Urteil über die spezifische Heilserumbehandlung der Ruhr bilden will, so wird der unbefangene Forscher bald zu seiner größten Verwunderung erkennen müssen, daß heute, trotzdem eigentlich die Serotherapie der Ruhr schon seit langem eingeführt und seither bei zahllosen Fällen im Rahmen größerer und kleinerer Epidemien zur Anwendung gelangt ist, noch immer ihr Wert oder Unwert zur Diskussion steht.

1) Primarius der Kinder-Abteilung des Kaiser-Franz-Josef-Spitals in Wien.
2) Aus der Kinder-Abteilung des Kaiser-Franz-Josef-Spitels in Wien.

Noch immer sind alle Schattierungen in der Bewertung des Ruhrserums zu finden, welche von begeisterter Anerkennung über mehr weniger große Skepsis bis zur völligen Ablehnung führen.

Die widersprechenden Urteile und Angaben, die Berichte über Versager könnten nun leicht dazu führen, auf eine Nutzlosigkeit der Serumbehandlung zu schließen. Ein solcher Schluß wäre aber sicher zu voreilig und würde den Schwierigkeiten in der Beurteilung und den tatsächlichen Verhältnissen in keiner Weise gerecht werden. Man braucht sich doch in diesem Zusammenhange nur an die Behandlung anderer Infektionskrankheiten mit Heilserum zu erinnern. Es ist dabei gar nicht einmal notwendig, daß man bloß an noch immer recht umstrittene Krankheiten denkt, wie beispielsweise an die Behandlung der Poliomyelitis im Frühstadium mit Rekonvaleszentenserum. Man findet vielmehr sogar heute noch bei einer Erkrankung wie die Diphtherie, welche doch gleichsam als Schulbeispiel für eine erfolgreiche Behandlung mit Heilserum angesehen werden muß, Stimmen, die dieser Therapie jeden Wert abstreiten wollen.

Gerade die Verhältnisse bei der Diphtherie, welche unter den Erkrankungen, die mit Serum behandelt werden, mit zu den beststudierten gehören und auch noch am klarsten zu durchschauen sind, zeigen uns deutlich, worauf es bei der Beurteilung des Serumerfolges ankommt und wo seine Grenzen gesteckt sind. Diese Erkenntnisse lassen sich auch bei der Serumbehandlung anderer Infektionskrankheiten immer wieder bestätigen und müssen daher Veranlassung geben, daß sie auch bei der Heilserumbehandlung der Ruhr entsprechend gewürdigt und den Besonderheiten dieser Erkrankung angepaßt werden.

Hier ist gleich voran die ebenfalls für die Therapie wichtige Tatsache anzuführen, daß eben das Zustandekommen des klinischen Symptomenbildes der Ruhr nicht einheitlicher Natur ist, sondern durch eine ätiologische Mehrheit bedingt wird. Wenn auch für unsere Breiten die Vielheit der Erreger eine Konzentration erfährt, so haben wir immer noch den verschiedenen serologischen und fermentativen Eigenschaften der einzelnen Typen der bei uns als Erreger in Frage kommenden gramnegativen Stäbchen Rechnung zu tragen. Sie alle können zwar in gewissen Grenzen das gleiche klinische Syndrom hervorrufen, aber es ist ohne Zweifel auch therapeutisch bedeutsam, daß wir unter ihnen die giftreichen Erreger vom Typ Shiga-Kruse und die oligotoxischen Typen, wie Kruse-Sonne, Flexner, Y usw. zu unterscheiden haben.

Das muß schon deswegen ganz besonders hervorgehoben werden, weil das Ruhrheilserum doch in erster Linie ein echtes antitoxisches Serum ist. Seine therapeutische Wirksamkeit beruht, wie Versuche mit lebenden Bakterien (Kolle, Schlossberger, Prigge) zeigen konnten, vor allem auf seinem Antitoxingehalt. Dies ist trotz des Umstandes zu beachten, daß bei der Herstellung der polyvalenten Sera die Tiere außer mit den Giften auch noch mit Leibessubstanzen der Ruhrbazillen geimpft werden, um so dem Serum auch noch eine bakterizide Wirkung zu verleihen. Auch der verschiedenen Natur der Gifte der einzelnen Ruhrbazillenstämme wird bei der Gewinnung der Heilsera Rechnung getragen, indem nicht nur die Ektotoxine von Shiga-Kruse, sondern auch Gifte von giftarmen Stämmen und deren Leibessubstanzen herangezogen werden. Diese verschiedenen Maßnahmen, über die in diesem Kreise nicht weiter gesprochen zu werden braucht, sollen den Bestrebungen nach einem möglichst polyvalenten, der verschiedenen Erregernatur der Bazillenruhr angepaßten Heilserum Rechnung tragen. Es hat aber den Anschein, daß die Wirkung der einzelnen, auf verschiedenen Wegen gewonnenen Ruhrsera trotzdem sehr weitgehend übereinstimmt. Es

steht auch ziemlich einheitlich fest, daß das Vorhandensein einer spezifischen bakteriziden Wirkung beim Ruhrheilserum für die praktische Therapie von keiner sehr großen Bedeutung ist. Dementsprechend sind auch die Grenzen der Wirksamkeit und die Indikationen der Anwendung von vornherein gegeben. So sind es jedenfalls in erster Linie die toxisch verlaufenden Ruhrfälle, welche für eine erfolgversprechende Serumbehandlung geeignet erscheinen. Das zeigen besonders auch die Erfahrungen hinsichtlich der Serumanwendung bei chronischer Ruhr, wo es völlig versagt. Die giftreichen Ruhrerreger vergiften von den Ulzerationen und Schleimhautbelägen und den Mesenterialdrüsen aus den Organismus, und Schittenhelm bezeichnet ja die Ruhr geradezu als eine „Diphtherie des Darms". Die Wirkung der Ruhrbazillengifte ist auch experimentell festgestellt worden, indem diese bei Versuchstieren, wenn sie parenteral einverleibt werden, imstande sind, auch ohne Anwesenheit der Erreger Dickdarmsymptome hervorzurufen.

Die in erster Linie antitoxische Wirkung des Ruhrserums kann sich natürlich nicht mehr auf die Besserung schon bestehender Schäden erstrecken. Sie richtet sich vielmehr vor allem auf die Neutralisation der im Darm oder Blut gebildeten Ektotoxine. Dadurch sollen anatomische oder funktionelle Giftschädigungen verhindert und die Heilung von eventuell schon gebildeten angebahnt werden.

Damit aber das Serum mit seiner antitoxischen Komponente diese Aufgaben erfüllen kann, ist es wie bei jeder antitoxischen Behandlung notwendig, daß das Serum möglichst frühzeitig verabfolgt wird, damit die von den Krankheitserregern gebildeten Giftstoffe so früh als möglich vernichtet werden, bevor sich noch irreparable oder fatale Auswirkungen der Vergiftung etablieren können. Daher steht ebenfalls bei der Ruhrserumtherapie die Frühestbehandlung mit dem Heilserum im Vordergrund. Selbst Friedemann, welcher der Serumtherapie ganz skeptisch gegenübersteht, sagt, daß die Krankheit bei jenen Fällen leicht zu verlaufen schien, die schon am ersten Krankheitstag gespritzt werden konnten.

Diese Forderung wird aber durchaus nicht in allen Fällen erfüllt, und ein guter Teil von Versagern kann darauf zurückgeführt werden, daß das Serum eben zu spät erst verabfolgt worden ist. Das hat zum Teil auch seinen Grund in den klinischen Besonderheiten der Ruhr. Auch von toxischen Ruhrstämmen hervorgerufene Krankheitsfälle brauchen durchaus nicht immer gleich foudroyant und mit den Merkmalen der toxischen Natur der Erkrankung zu beginnen, sondern können schleichend und unter dem Bilde einer zunächst leicht und atoxisch erscheinenden Form einsetzen. Erst der weitere Verlauf der Krankheit klärt dann über die wahre Natur der Erreger auf, und das kann erst in einem Zeitpunkt des Krankheitsgeschehens der Fall sein, wo es für eine erfolgreiche Serumbehandlung bereits zu spät ist.

Ein weiteres wichtiges Augenmerk ist der entsprechenden Dosierung des Serums zu schenken. Dies zeigen sowohl experimentelle Untersuchungen als auch die Erfahrungen am Krankenbett. Die Bindung des Antitoxins mit dem zugehörigen Toxin erfolgt entsprechend dem Gesetz der multiplen Proportionen, und Kolle, Schlossberger und Prigge kommen auf Grund ihrer experimentellen Ergebnisse zu dem Schlusse, daß es sich empfehlen dürfte, den Mindestgehalt der für die menschliche Therapie bestimmten Dysenteriesera an Antitoxineinheiten recht erheblich zu erhöhen.

In diesem Sinne sprechen auch die Erfahrungen am Krankenbett, wie sie besonders in großem Maßstabe während des Weltkrieges gewonnen werden konnten (Schittenhelm, Mathes, Meyer u. a.). Recht eindrucksvoll sind in dieser Hinsicht unter anderem die Kriegserfahrungen, über die Meyer

berichtete. Trotzdem der Genius epidemicus schwerer wurde, waren bessere Heilresultate zu verzeichnen, welche nur auf eine in noch größerem Stil durchgeführte spezifische Behandlung mit Serum zurückgeführt werden können. Als Grund für den auffallenden Gegensatz zwischen dem Nutzen der Ruhrserumbehandlung im Felde und den in der Heimat damit gemachten ungünstigen Resultaten werden die außerordentlich kleinen Dosen (20—30 ccm) angesehen, da diese wirkungslos sind.

Solche Erfahrungen führten dazu, daß die Dosierung des Ruhrserums vielfach höher vorgeschlagen und angewendet wird, und zwar in Dosen, die sich um die von Schittenhelm auf der Warschauer Tagung empfohlenen Mengen bewegen oder sie sogar noch überschreiten (das sind also 50—80 ccm Shiga-Kruse-Serum, bzw. 80—100 ccm polyvalentes Serum). Aus dem gleichen Grunde empfiehlt es sich auch, immer höchstwertige Sera zu verwenden.

Auch bei der spezifischen Therapie mit Ruhrserum hat man sich immer nach den Verhältnissen und dem Verlauf jedes einzelnen Falles zu richten. Wenn man auch mit den derzeit zur Verfügung stehenden Präparaten gewöhnlich mit Dosen von 30—50—100 ccm, die intramuskulär eingespritzt werden, sein Auslangen findet, so muß man bei schwereren, vorwiegend toxischen Krankheitsfällen eventuell doch noch größere Serumdosen anwenden. Bei schwersten Fällen soll man gleich von vornherein mindestens 30 ccm intravenös spritzen, das übrige, bis auf 100, ja 200 ccm, intramuskulär. Dabei wird die tägliche Wiederholung dieser Serumgabe durch 2—3—4 Tage gegebenenfalls zweckmäßig sein und die Serumwirkung steigern. Dies soll dann geschehen, wenn auf die ersten Injektionen hin noch keine Besserung zu verzeichnen ist. Jedenfalls wird dieses Vorgehen von einer Reihe von Autoren empfohlen (Schittenhelm, Brauer u. a.).

Daß diese Serumdosierung nicht nur auf das Erwachsenenalter Bezug hat, sondern auch für das Kindesalter, wo besonders beim Säugling der Wert der Serumtherapie sehr umstritten ist, zeigen unter anderem sehr schön die Beobachtungen Knauers. Dieser konnte auf Grund jahrelanger Erfahrungen feststellen, daß ein Serumerfolg nur dann zu erwarten ist, wenn man genügend große Dosen gibt. Dadurch, daß er dazu übergegangen ist, in allen schweren Fällen große, mitunter sogar horrible Serumdosen zu verabfolgen, haben sich seine Heilerfolge wesentlich gebessert.

Das ist aber von nicht zu unterschätzender praktischer Bedeutung. Denn wenn auch natürlich kein Lebensalter verschont bleibt, so lehren doch die Erfahrungen, daß gerade die jüngeren Kinder auch durch die Pseudodysenterien nicht nur häufiger betroffen, sondern auch schwerer gefährdet werden (Kruse, Elkeles und Schneider, Leuchs und Plochmann, Grosser, Häßler, Seidlmayer). Es scheint, daß die giftarmen Ruhrerreger für Erwachsene und auch schon für ältere Kinder im allgemeinen doch weniger stark pathogen sind, und es findet sich demnach in den Statistiken die höchste Morbidität und Mortalität im ersten Lebensjahre.

Die Einverleibung so großer Serummengen ist natürlich besonders bei kleineren Kindern und Säuglingen schwer durchzuführen, da die intravenöse Injektion oft überhaupt ausgeschlossen ist oder doch zumindest große Schwierigkeiten bereitet und die intramuskuläre Injektion nur beschränkte Mengen zuläßt. Man ist daher im Kleinkindesalter vielfach dazu übergegangen, für die Einverleibung größerer Serumdosen die intraperitoneale Injektion heranzuziehen. Diese läßt sich ohne besondere technische Schwierigkeiten und ganz gefahrlos durchführen, und man ist damit imstande, auf einmal eine große Serumdosis an eine Stelle zu bringen, von der aus eine rasche Resorption erfolgt.

Die Beobachtungen Knauers, die an einem besonders schlechten und schweren Material gewonnen wurden, decken sich im allgemeinen mit den beim Erwachsenen gemachten Erfahrungen. Die Letalität seiner nicht mit Serum behandelten Fälle betrug 42,9 Proz., die der Behandelten 30,4 Proz. Dazu ist aber noch zu bemerken, daß gewöhnlich nur die Fälle mit Serum behandelt wurden, welche einen schwer kranken, insbesondere toxischen Eindruck machten, während bei den nicht mit Serum behandelten Kindern die Mehrzahl leichterer Natur war und diese trotzdem die höhere Letalitätsziffer aufwiesen. Weiter ist noch zu berücksichtigen, daß eine Reihe von den mit Serum injizierten Kindern bereits ganz kurze Zeit nach der Serumapplikation ad exitum gekommen ist. ehe noch das Serum eine Wirkung entfaltet haben konnte. Unter der Würdigung dieser Momente würde sich das Gesamtresultat noch weiter zugunsten der Serumbehandlung verschieben.

Die Erfahrungen Knauers bestätigen außerdem wieder die Tatsache, daß die Aussichten auf eine rasche Heilung um so bessere sind, je früher die Injektion einer großen Dosis erfolgt. Dabei sind einige große Injektionen unbedingt der Darreichung verzettelter kleiner Dosen vorzuziehen.

Auch Kuhle tritt warm für die Serumtherapie ein; er sah glänzende Erfolge mit Ruhrserum bei einer Bazillenruhrepidemie im Säuglingsalter.

Stettner behandelte bei einer schweren Ruhrepidemie im Jahre 1920 nebeneinander Kinder mit und ohne Ruhrserum. Von den nichtinjizierten starben 18,7 Proz., von den injizierten 14.3 Proz. Dabei war hervorzuheben, daß bei Injektionen in den ersten drei Tagen der Krankheit kein Kind verloren ging und die Verstorbenen erst am 5. und 6. Krankheitstag gespritzt werden konnten. Das klinische Bild der Serum-behandelten Kinder war dadurch ausgezeichnet, daß sie nicht den gleichen Turgorverlust und keine so hochgradige Allgemeinerkrankung aufwiesen. Diese etwas ausführlicheren Hinweise auf die Verhältnisse des frühen Kindesalters sind dadurch gerechtfertigt, weil unter den gegenwärtigen epidemiologischen Verhältnissen die Ruhr in dieser Altersstufe sowohl zahlenmäßig als auch hinsichtlich der Schwere des Verlaufes hervorsticht.

Die günstige Wirkung des Ruhrserums bei den schweren Fällen äußerst sich in erster Linie in der raschen Entgiftung des Organismus und damit in dem Verschwinden der allgemeinen toxischen Symptome. wie Prostration und nervöse Beschwerden, dann in einer Hebung des Pulses und in der im Gesicht der Kranken sich ausprägenden größeren Ruhe. Hierher gehören auch die Fälle, welche zum Teil als Ruhrenzephalitis bezeichnet werden. Wir finden bei diesen durch Tage hindurch schwerste zerebrale Symptome mit hochgradiger Benommenheit, tonisch-klonischen Krämpfen, Hyperkinesen, meningealen Erscheinungen wie Nackensteifigkeit und starken Dermographismus.) Der schon früher ausgesprochene Zweifel, daß es sich hierbei nicht um eine echte Enzephalitis, sondern vielmehr um toxische Schädigungen des Zentralnervensystems handelt, wird durch die prompte Wirkung der Serumbehandlung nur noch bestärkt.

Die Serumwirkung beschränkt sich keineswegs nur auf Fälle, die vom Typus Shiga-Kruse hervorgerufen sind, sondern kann auch bei bakteriotoxischen Zustandsbildern zu finden sein, welche von anderen Ruhrerregern hervorgerufen werden.

Die Gefahr der Vergiftung bei bakterieller Ruhr wird zwar vorwiegend durch die Toxizität der Erreger bedingt, aber sie kann auch durch eine alimentäre Komponente für sich allein oder aufgepfropft auf eine bakteriotoxische Ruhr ausgelöst werden. Hier sind es vor allem Austrocknungserscheinungen infolge ungenügender Flüssigkeitszufuhr, allzulange Vorenthaltung der Nah-

rung, bzw. eine schädliche Ueberschreitung der verminderten Nahrungstoleranz, die ihrerseits zu Intoxikationserscheinungen führen können. Dieses als Intoxikation bei Ruhr bezeichnete Zustandsbild wird natürlich nicht durch eine Serumbehandlung beeinflußt, sondern muß durch gesonderte Maßnahmen bekämpft werden. Jedenfalls sind diese Zustände nicht nur bei der Behandlung einer Ruhr an und für sich, sondern auch bei der Beurteilung der Serumbehandlung zu berücksichtigen.

Die günstige Wirkung auf bakteriotoxische Zustandsbilder, welche schon 6—15 Stunden nach der Serumeinverleibung auftreten kann, bezieht sich ebenfalls auf die Schmerzen und Tenesmen. Diese lassen in gleicher Weise daraufhin nach. Daher sollen immer auch frische Ruhrfälle mit solch heftigen quälenden Beschwerden der Serumbehandlung unterzogen werden. Die Wirkung auf andere Ruhrerscheinungen ist zumindest nicht derart konstant. Es wird zwar immer wieder berichtet und beobachtet, daß die Dauer des Fiebers und die Periode der zahlreichen und blutigen Stühle verkürzt und damit auch durch das Serum die Dauer der Erkrankung wesentlich verringert wird. Infolge dieser Wirkung sieht Bujwid in dem Dysenterieserum nicht nur ein Heil- und prophylaktisches Mittel, sondern auch ein Mittel, das durch die bedeutende Verminderung der Entleerungen bei den Patienten von 40—50 auf 6—10 Stühle pro Tag schon am Tag nach der Serumeinspritzung auch direkt die Gefahr der Ansteckung herabzusetzen imstande sei.

Entgegen diesen Fällen, bei denen der Patient schon nach 2—8 Tagen Rekonvaleszent wird, gibt es aber noch genug Fälle, wo trotz einer günstigen allgemeinen Wirkung des Serums die Fieberdauer und die Anzahl und Beschaffenheit der Stuhlentleerungen unbeeinflußt bleiben. Solche Beobachtungen zeigen also, daß auch bei einer an sich günstigen Wirkung der Serumbehandlung die Krankheitsdauer dadurch nicht immer abgekürzt werden kann, und weiter scheinen auch die pathologischen Vorgänge am Darm dadurch nur wenig beeinflußt zu werden.

Stettner weist aber mit Recht darauf hin, daß die spezifische Serumbehandlung gewichtsparend wirkt und durch Zurückhaltung von Gewebswasser der Austrocknung des Körpers entgegenarbeitet, wenn sie nur rechtzeitig und in ausreichender Dosis angewandt wird. Gerade in dieser Wirkung ist aber ein nicht zu unterschätzender Faktor in der Ruhrbehandlung gegeben, weil besonders der Wasserverlust den Organismus in einen sehr bedrohlichen Zustand bringt.

Es besteht eigentlich keine Meinungsverschiedenheit mehr darüber, daß die spezifische Therapie der Ruhr mit Heilserum sich im allgemeinen auf die Fälle von Ruhr, welche mit schweren toxischen Symptomen, also starkem Wasserverlust, mit zentralen Erscheinungen usw., dann mit subjektiv sehr quälenden Tenesmen verlaufen, beschränken kann, aber in solchen Fällen auch angewendet werden soll. Es hat also die Indikation zur Serumbehandlung in erster Linie, sowie das beispielsweise auch bei der Diphtherie der Fall ist, nach rein klinischen Gesichtspunkten zu erfolgen. Es wäre jedenfalls verfehlt, wenn man im frühen Beginn der Erkrankung die Diagnose nach rein bakteriologischen und serologischen Prinzipien stellen wollte, da damit nur kostbare Zeit für die Serumbehandlung verlorenginge.

Abgesehen von der Zeit, die bis zur möglichen Erkennung der Erregernatur verstreicht, muß man ja auch damit rechnen, daß der bakteriologische Nachweis keineswegs immer gelingt, besonders wenn das Untersuchungsmaterial nicht ganz frisch ist. Es läßt daher ein negativer Ausfall der Untersuchung keineswegs die spezifische Dysenterienatur einer fraglichen Erkrankung ausschließen.

Hinsichtlich der klinischen Ruhrdiagnose muß aber auch auf das Verhalten der Stuhlbeschaffenheit verwiesen werden. Vielfach wird in der Praxis nur dann mit der Möglichkeit einer Ruhr gerechnet, wenn Blutbeimengungen in den Entleerungen enthalten sind. Demgegenüber muß aber für die Diagnose der Dysenterie besonders im Kindesalter festgestellt werden, daß die Stühle sehr häufig lediglich Eiter- und Schleimbeimengungen enthalten, Blut aber vermissen lassen. Diese Feststellungen sollen durch einige Angaben aus dem Schrifttum illustriert werden. So fand Grosser in nur 25 Proz. seiner beobachteten Ruhrfälle Blutbeimengungen im Stuhl, Kovacs in etwa 33 Proz., Soukharcoa in 43 Proz., Seidlmayer wieder nur in 22,5 Proz. Die mangels charakteristischer Stühle unerkannt verlaufenden Fälle von Ruhr im Säuglings- und Kleinkindesalter dürften daher eine nicht geringe Zahl darstellen.

Aehnlich wie mit dem bakteriologischen Nachweis der Ruhrerreger verhält es sich übrigens auch mit der Bestimmung des Agglutinationstiters im Serum der Patienten für die Ruhrdiagnose. Denn abgesehen davon, daß der Agglutinationstiter erst verhältnismäßig spät genügend hohe Werte annimmt und damit die Möglichkeit einer Frühdiagnose auf diesem Weg von vornherein ausgeschlossen ist, sind die serologischen Untersuchungen bei der Ruhr überhaupt keineswegs so zuverlässig wie bei anderen Erkrankungen, z. B. Typhus und Cholera. So kann die Agglutination besonders bei sehr schweren Ruhrfällen, dann bei Kindern und alten Leuten überhaupt ausbleiben. Außerdem muß man mit Schwierigkeiten auch in der Beurteilung positiver Befunde rechnen, da diese durch gelegentliche Paragglutination von Ruhrbazillen durch das Serum von Erkrankten hervorgerufen werden können, welche an Infektionen mit Typhus-, Paratyphus, Colibazillen und anderen Keimen leiden.

Wenn auch die schweren Fälle in der Mehrzahl durch Shiga-Kruse-Bazillen allein oder durch Mischinfektionen mit ihnen hervorgerufen sind, so ist das doch nicht ausschließlich der Fall. Der bakteriologische Nachweis zeigt vielmehr, daß sehr häufig kein Zusammenhang zwischen Verlauf und Erregerart nachzuweisen ist. So können nicht nur Einzelfälle, sondern auch ganze Epidemien, die durch die Erreger der giftarmen Typen hervorgerufen werden, schwer verlaufen, wie umgekehrt auch vom Shiga-Kruse-Bazillus bedingte Epidemien mitunter einen milden Charakter besitzen. Es kann überhaupt der Genius epidemicus der einzelnen Epidemien unabhängig von dem Vorhandensein einer bestimmten Bakterienrasse örtlich stark voneinander abweichen, und es zeigt sich immer wieder, daß man aus einem kleinen Material keine allgemeingültigen Schlüsse ziehen darf. Auch das Alter der Erkrankten und ihr Ernährungszustand wirken sich auf die Schwere und Letalität einer Ruhrepidemie aus.

Es muß außerdem, was sowohl für die Beurteilung der Serumtherapie als auch für die Indikationsstellung hierzu wichtig ist, hervorgehoben werden, daß auch der klinische Verlauf einer Ruhr manchmal recht unberechenbar ist. So können Fälle, die scheinbar ganz leicht beginnen, im weiteren Verlaufe sehr schwere Grade annehmen. Umgekehrt kann man es aber auch erleben, daß anfänglich schwer erscheinende Ruhrerkrankungen ohne irgendwelche kausale Behandlung einen plötzlichen und unerwarteten Umschwung zur Besserung zeigen.

Es ist klar, daß unter solchen Umständen bei der an sich notwendigen Indikationsstellung zur Serotherapie nach rein klinischen Gesichtspunkten, wobei also im Interesse der Frühbehandlung das Resultat der bakteriologischen Untersuchung nicht abgewertet werden darf, Ruhrfälle verschiedener Erreger-

natur der Serumbehandlung unterworfen werden, also nicht nur echte Shiga-Kruse-Erkrankungen, sondern auch von den giftarmen Erregern hervorgerufene Pseudodysenterien. Das ist auch der Grund, warum man im allgemeinen polyvalente Ruhrsera bei der Einleitung der Serumbehandlung bevorzugt. Die Polyvalenz setzt aber nicht unbedingt eine verläßliche Wirkung auf die Toxine des Einzelfalles voraus, und man wird daher nicht in jedem Falle mit einer wirklichen Spezifität und Neutralisation der Gifte rechnen dürfen.

Die Tatsache, daß ein günstiger therapeutischer Erfolg mit Ruhrserum um so eher zu erwarten ist, je frühzeitiger es zur Anwendung gelangt, spricht mit für das Vorherrschen der antitoxischen Quote. Demgegenüber ist das Vorhandensein einer spezifischen bakteriziden Wirkung noch keineswegs so sichergestellt, wenn auch bei der Herstellung der polyvalenten Sera darauf Bedacht genommen wird. Wenn man aber die Berichte über die therapeutische Wirksamkeit des polyvalenten Ruhrserums bzw. monovalenten Shiga-Kruse-Serums bei den gewöhnlichen Pseudodysenterien durchsieht, so findet man hier die größten Widersprüche. Es ist die Beurteilung der Serotherapie bei ihnen deshalb so schwer, weil es sich hier immerhin in der Mehrzahl um Formen handelt, die atoxisch und schließlich doch relativ günstig verlaufen.

Tatsächlich scheint es auch, daß diese bakterizide Quote des Ruhrserums wenigstens zum Teil unspezifischer Natur ist, indem das Serum hier im Sinne einer Proteinkörpertherapie umstimmend wirkt und so günstige Allgemeinwirkungen hervorruft. Knauer weist in diesem Zusammenhang auf die Beobachtung hin, daß beispielsweise die kachektische Tuberkulinreaktion bei Meningitis tuberculosa unter unspezifischer Serumtherapie aufflammt. Für eine unspezifische Wirkung des Ruhrserums bei Pseudodysenterien spricht auch, daß bei diesen im Gegensatz zur Shiga-Kruse-Ruhr, wo nur das spezifische antitoxische Serum wirksam ist, auch monovalentes Shiga-Kruse-Serum und ebenso normales Pferdeserum den gleichen Erfolg hervorrufen können (Singer, Dorendorff und Kolle, Matthes, Kruse, Vaillard und Dopter, Graham, Knauer, Czylharz und Neustadtl).

Da diese Wirkung des Serums, auch wenn man sie zum Teil oder ganz als unspezifisch auffassen muß, aber den therapeutischen Bestrebungen entspricht und außerdem eine schädliche Beeinflussung durch Shiga-Kruse- oder polyvalentes Serum nie beobachtet werden muß, so ist die Serumbehandlung auch in solchen Fällen von Ruhr immer indiziert. Es wird allerdings auch bei der Indikationsstellung zur Serumbehandlung nach klinischen Gesichtspunkten die Anwendung des Serums bei Pseudodysenterien viel weniger häufig in Frage kommen, weil diese ja im allgemeinen doch nicht so oft schwer und toxisch verlaufen.

Uebrigens muß auch in den zur Ruhrbehandlung neuerdings immer mehr und mehr herangezogenen Bluttransfusionen, über die ebenfalls gute Erfolge berichtet werden (Hainiß, Wilke, Häßler, Loeschke), in gleicher Weise zum wesentlichen eine unspezifische Beeinflussung und Resistenzsteigerung erblickt werden. Allerdings ist leider diese günstige Wirkung einer Bluttransfusion auf das Allgemeinbefinden in manchen Fällen nur eine vorübergehende (Loeschke und Häßler).

Es ist in der Art des Ruhrserums und auch des Krankheitsgeschehens bei den giftarmen Ruhrfällen gelegen, daß die spezifische Heilserumbehandlung nicht jenen Erfolg zeitigt, wie das bei der Behandlung der toxischen Symptome der giftreichen Ruhrerkrankungen im allgemeinen der Fall ist. Außerdem sind es die recht ungleichmäßige Beeinflussung der Stuhlbeschaffenheit und der Ausscheidung der Ruhrkeime bzw. das in einem gar nicht un-

beträchtlichen Teil aller Ruhrerkrankungen zu verzeichnende Ausbleiben jeglichen Einflusses des Serums in dieser Hinsicht, welche eine Erweiterung der Wirkung der spezifischen Therapie auch auf diese Komponenten wünschenswert erscheinen ließen.

Hier wären nun die spezifischen Methoden anzuführen, welche entweder als Ergänzung der Serumbehandlung der Ruhr noch herangezogen werden können oder bei den oligotoxischen Ruhrformen, wo primär für eine Serumbehandlung keine klinische Veranlassung besteht und diese auch nicht sehr große Aussichten verspricht, für sich allein angewendet werden können. Diese würden sicher bei den Ruhrerkrankungen unter den gegenwärtigen Verhältnissen die größere Aktualität besitzen, weil ja hier die giftarmen Ruhrbazillen in der Hauptsache als Erreger in Frage kommen und daher die Serumbehandlung für gewöhnlich kaum eine nennenswerte Rolle zu spielen braucht.

Unter diesen Behandlungsverfahren sind einmal zu nennen die aktiv immunisierenden Vakzineimpfstoffe, darunter auch der Boehnckesche Vakzine-Ruhrheilstoff. Die Ansichten über diese Behandlungsmethoden, von denen die letztere aus abgetöteten Ruhrbazillen verschiedener Typen unter Zusatz von antitoxischem Serum besteht, sind jedoch noch durchaus umstritten.

Eine weitere spezifische Art der Behandlung ist die Verwendung von Bakteriophagen, die bekanntlich auf d'Herelle zurückgeht. Die Erfahrungen hierüber sind wieder sehr widerspruchsvoll sowohl bei peroraler als auch subkutaner Zufuhr. Ueber günstige Erfolge berichten u. a. Suzuki, Spence und Kinley, Compton, Eivin und Vechsler. Eine besondere Form der Bakteriophagenbehandlung hat Metzger angegeben. Er führt Spülwasser aus dem Darm eines gesunden Menschen, das durch dicke Gaze filtriert wurde, zweimal täglich vierzehn Tage hindurch als Verweilklysma ein und berichtet über guten Erfolg mit seiner Methode.

Eine ganze Reihe von Untersuchern, wie Dawison, Otto und Munter, Stanley, Garfinkle und Goddard, Taylor, Greval und Thaut, Häßler, lehnen aber einen günstigen Einfluß der Phagentherapie bei der Ruhr ab.

Aus der jüngsten Zeit liegen Erfahrungen über den Wert der Phagenbehandlung aus der Münchner Kinderklinik vor, über die Seidlmayer berichtet. Die Phagen wurden hier teils für sich allein, bei bakteriotoxischem Krankheitsbild zusammen mit Serum gegeben, und zwar meist per os, in einigen Fällen auch rektal. Wegen der großen Säureempfindlichkeit der Phagen wird bei der oralen Darreichung großer Wert darauf gelegt, daß ca. eine halbe Stunde vor der Phagenmedikation Magnesia usta und Natriumbikarbonat gegeben werden.

Es handelt sich bei der in Rede stehenden Arbeit um recht sorgfältige klinische Beobachtungen, die für den Wert der Phagenbehandlung sprechen. Es zeigte sich, daß die Phagen wohl auf den Zeitpunkt der Abfieberung keinen Einfluß zu haben scheinen, daß sich aber die Phagenwirkung im Zeitpunkt des Verschwindens der Ruhrbakterien im Stuhl und ganz besonders bezüglich der Stuhlqualität äußert. Die mit Phagen behandelten Fälle waren durchschnittlich am 7,6. Behandlungstag bakteriologisch negativ, die unbehandelten Kontrollfälle am 12,5. Was die Stuhlbeschaffenheit anlangt, so zeigten die Phagenfälle durchschnittlich am 9. Behandlungstag normale Stühle, die Kontrollfälle erst am 19,1.

Für die Praxis ist ferner wichtig, daß an der Münchner Kinderklinik auch E-Ruhrfälle, welche oft wochenlang ohne Erfolg unspezifisch behandelt worden waren, nach Einleitung der Phagentherapie in kurzer Zeit geheilt werden konnten, so daß also für den Erfolg der Phagenbehandlung keines-

wegs die frühe Erfassung allein ausschlaggebend ist. Für die Möglichkeit einer spezifischen Phagentherapie ist überhaupt erst das Ergebnis der bakteriologischen Untersuchung Voraussetzung, so daß also auf jeden Fall etwa zwei Tage damit zugewartet werden muß.

Die Berichte aus der Münchner Kinderklinik klingen jedenfalls sehr ermunternd und lassen es empfehlenswert erscheinen, die Bakteriophagentherapie mit zur Ruhrbehandlung heranzuziehen. Das kann um so unbedenklicher erfolgen, als es sich hierbei um eine absolut harmlose Behandlungsart handelt, die außerdem ohne Belästigung der Kranken durchgeführt werden kann.

Wir haben versucht, einen allgemeinen Ueberblick über den Stand der spezifischen Ruhrbehandlung vom Standpunkt des Klinikers aus zu geben; wir glauben, damit auch feststellen zu dürfen, daß die noch immer anzutreffende Skepsis über den Wert der spezifischen Ruhrbehandlung, von der wir eingangs gesprochen haben, allgemein einer ruhigen Beurteilung weichen sollte. Dazu ist es nur notwendig, daß man die Indikationen, die Grenzen der Wirksamkeit, die notwendige Dosierung des Serums usw. kennt. Dann wird man insbesondere die Ruhrserumbehandlung als das erkennen und zu schätzen wissen, was sie tatsächlich ist, nämlich als eine wertvolle Unterstützung des übrigen therapeutischen Vorgehens, die man sich nicht entgehen lassen soll. Es ist allerdings im Wesen der Ruhrerkrankung gelegen, daß alle uns zur Verfügung stehenden therapeutischen Maßnahmen in geeigneter Weise zusammenwirken müssen, um den erreichbaren Erfolg auch wirklich erzielen zu können. Auch das ist wichtig für die richtige Einschätzung einer spezifischen Therapie und schützt gleichermaßen vor kritikloser Ueberschätzung wie auch vor hoffnungsloser Ablehnung des Serums. Das Ruhrserum stellt eben nur einen, in manchen Fällen allerdings sehr wichtigen und direkt lebensrettenden Faktor innerhalb der gesamten Ruhrtherapie dar. Außerdem ist aber die richtige Anwendung der übrigen therapeutischen Hilfsmittel ernährungstechnischer und medikamentöser Natur, der Sorge für genügende Flüssigkeitszufuhr usw. nicht zuletzt oft von ausschlaggebender Bedeutung für den Verlauf und den Ausgang einer Ruhr.

Vorträge.

1. Th. Wagner-Jauregg (Frankfurt a. M.)[1]:

Chemische Eigenschaften des Shiga-Kruse-Toxins und -Endotoxins [2].

(Nach Versuchen mit Richard Prigge, Erica Helmert und Lena Kicksch.)

Die über Phosphorpentoxyd scharf getrockneten Bazillen wurden zuerst mit physiol. Kochsalzlösung behandelt. Der Kochsalzextrakt ergab durch Trichloressigsäurefällung bei p_H 5—3,3 das Toxin, die dialysierte Restlösung lieferte bei der Alkoholfällung ein Endotoxinpräparat, das als Fraktion II bezeichnet wird. Aus den mit physiol. NaCl extrahierten Bazillen wurde durch n/4 Trichloressigsäure die Endotoxin-Fraktion I herausgelöst.

1) Aus dem Forschungsinstitut für Chemotherapie zu Frankfurt a. M.

2) Die vorgetragenen Ergebnisse werden an anderer Stelle nach ihrem Abschluß ausführlich veröffentlicht werden.

Das hitzelabile Toxin der Shiga-Kruse-Ruhrbazillen ließ sich durch fraktionierte Fällung mit Ammonsulfat weiter reinigen. Seine chemischen Eigenschaften entsprechen denen eines Proteins. Die besten Präparate besaßen eine Toxizität von 1—4000 dl/mg (Maus). Ein kochbeständiges Toxin, wie es Istrati beschreibt, konnte nicht aufgefunden werden.

Die Endotoxin-Fraktion I entsprach in ihrer Toxizität und analytischen Zusammensetzung ungefähr dem von Boivin und von Morgan beschriebenen Präparat. Sie enthielt 10 dl/mg (Maus), 5 Proz. Stickstoff und 1,1—1,3 Proz. Phosphor. Durch Aluminiumhydroxydfällung veränderten sich die analytischen Werte nicht wesentlich, die Toxizität stieg auf 20 dl/mg. Der Stickstoffgehalt der Fraktion II war höher (6,1—9.5 Proz. N) bei einer Toxizität von 10—20 dl/mg. Es ist noch unentschieden, ob die beiden Fraktionen chemisch verschiedenen Substanzen entsprechen oder ob ihre weitere Reinigung zu identischen Produkten führen wird. Boivin zeigte, daß die Endotoxine Gram-negativer Bakterien, zu denen auch der Shiga-Kruse-Bazillus gehört, Kohlehydrat-Lipoid-Komplexe sind. W. Th. Morgan erhielt bei der Hydrolyse eines Shiga-Kruse-Endotoxins außer einem Polysaccharid und einer wachsartigen Substanz noch Aminosäuren, die möglicherweise einer Polypeptidkette entstammen.

M. Umezu und Th. Wagner-Jauregg fanden, daß die Gerüstsubstanz der Tuberkelbazillen ebenfalls aus Wachsen, Kohlehydraten und Aminosäuren besteht. Vielleicht sind diese Stützsubstanzen und die Endotoxine nach einem ähnlichen Prinzip aufgebaut. Der wesentliche Unterschied in den Löslichkeitseigenschaften beider Gruppen von Substanzen könnte unter anderem durch die Molekulargröße bedingt sein.

Auf die „antiendotoxische Chemotherapie“ nach Levaditi mit bestimmten aromatischen Sulfamiden, Sulfonen und Sulfoxyden wird hingewiesen.

2. W. Donle[1] (Wien):

Die geographische Verbreitung der Ruhr in Deutschland.

Die Epidemiologie einer Krankheit baut sich, neben der Berücksichtigung anderer Gegebenheiten, auch auf den Tatsachen der geographischen Verbreitung und des zeitlichen Ablaufs der Krankheitsfälle auf. Sowohl die induktive wie die deduktive Forschung sind genötigt, sich mit den geographischen und zeitlichen Verhältnissen bei dem Auftreten einer Seuche auseinanderzusetzen. Daher möchte ich einen kurzen Ueberblick über die geographische Verbreitung der Ruhr in Deutschland geben und dabei folgende Zeitabschnitte berücksichtigen:

1. Ruhrverbreitung in der vorbakteriologischen Zeit (auf Grund der historisch geographischen Pathologie von August Hirsch und anderen Angaben).
2. Die Ruhrverbreitung vor dem Kriege.
3. Die Ruhrverbreitung nach dem Kriege. diese beiden Punkte werden auf Grund der amtlichen Meldungen dargestellt.

1) Oberstabsarzt und Hygieniker beim Wehrkreisarzt XVII.

Die Angaben aus früherer Zeit können natürlich nicht denselben Anspruch auf Genauigkeit und Zuverlässigkeit machen, wie etwa die jüngeren und jüngsten Berichte, aber einiges ist doch auch daraus zu entnehmen. Es ist immerhin interessant, daß bei 8 Ruhrepidemien, welche unabhängig von kriegerischen Ereignissen in der Zeit nach dem dreißigjährigen Krieg bis jetzt in Deutschland größeren Umfang angenommen haben, als Hauptverbreitungsgebiete 5mal die Rheinlande und Westfalen, 5mal die Mark Brandenburg, 4mal Sachsen genannt sind. Süddeutschland ist häufig angeführt, und zwar besonders Württemberg und Baden. Die Epidemie von 1853 bis 1855 betraf nur Baden, Württemberg, die Rheinpfalz, Elsaß-Lothringen und das benachbarte Frankreich, wo die Seuche zuerst aufgetreten war.

Folgende Länder werden nur einmal genannt: Preußen, Pommern, Mecklenburg, Hannover-Oldenburg und Bayern südlich der Donau, nicht genannt wird Schleswig-Holstein. Sehr merkwürdig ist die ausdrückliche Angabe an vielen Stellen der Literatur, daß die ländlichen Gegenden wesentlich mehr von der Ruhr heimgesucht wurden als die Stadt. Aus der Zeit des 19. Jahrhunderts sowohl wie aus der Zeit vor dem Kriege fehlen Angaben über Einzelfälle in den einzelnen Gegenden Deutschlands fast vollkommen. Nur bei gehäuftem Auftreten von Ruhrfällen erfolgte eine einigermaßen erschöpfende Berichterstattung. In der Zeit vor dem Kriege sind im wesentlichen zwei Gebiete stark von Ruhr befallen, und zwar die Regierungsbezirke Gumbinnen und Danzig auf der einen Seite, die Regierungsbezirke Arnsberg, Düsseldorf und Münster auf der anderen Seite. Es bestehen große Unterschiede in der Zahl der Fälle in den einzelnen Jahren, ich möchte als Beispiel die Jahre 1902 und 1903 für Preußen herausgreifen.

Im Jahre 1902 werden für Preußen 947 mit 51 Todesfällen angegeben. Von dieser Zahl fielen 803 mit 36 Todesfällen auf die Regierungsbezirke, welche am Ruhrgebiet Anteil haben. Im Jahre 1903 wurden in Preußen 1340 Fälle mit 83 Todesfällen gezählt, davon fielen 233 Krankheitsfälle mit 14 Todesfällen auf den Regierungsbezirk Gumbinnen. 616 Krankheitsfälle mit 34 Todesfällen auf die Regierungsbezirke im Ruhrgebiet.

Wesentliche Ruhrvorkommen in den süddeutschen Staaten bestanden vor dem Kriege nicht.

Ueber Ruhr in Sachsen konnte ich genauere Mitteilungen für die Zeit vor dem Kriege nicht erhalten.

Der Weltkrieg brachte ein ziemliches Ansteigen der Ruhr, erst mehrere Jahre nach Beendigung des Krieges traten einigermaßen normale Verhältnisse in dem Ruhrvorkommen ein.

So sehen wir im Jahre 1926 bei 4224 Ruhrfällen im ganzen Reich, daß im wesentlichen 4 Gebiete, nämlich Berlin, Leipzig, Ruhrgebiet und Oberschlesien über die Hälfte der gesamten Ruhrfälle meldeten, wovon auf das Ruhrgebiet allein 1260, das ist fast $1/3$ der gesamten Meldungen kamen.

Ich habe gerade das Jahr 1926 herausgegriffen, da es einesteils noch gewisse Rückschlüsse auf die Verbreitung der Ruhr in und nach dem Kriege zuläßt, denn auch hier waren die genannten Gebiete besonders stark von der Seuche befallen, auf der anderen Seite aber das Auftreten der E-Ruhr noch keinen wesentlichen Einfluß auf die Ruhrzahlen gehabt haben kann. Im Jahre 1937 schnellte die Zahl der gemeldeten Ruhrfälle von 4794 im Jahre 1936 auf 7545 hinauf. Von den 3300 Fällen in Preußen fielen 2000 auf Berlin und das Ruhrgebiet mit seinen angrenzenden Großstädten. Die stärkste Verbreitung meldete Sachsen mit 2300 Fällen, d. i. fast $1/3$ der Gesamtsumme. Von den aus Bayern gemeldeten über 1000 Fällen fielen 575 auf Oberbayern, davon wieder 316 auf München. Besonders merkwürdig ist, daß seit dem

Auftreten der E-Ruhr ein Gebiet in dem bisher nie von Ruhr die Rede gewesen ist, nämlich Schleswig-Holstein, dauernd recht erhebliche Ruhrzahlen aufweist, für das Jahr 1937 260, das benachbarte Hamburg 266. Sonst sind zur Zeit nur stark bevölkerte, ja man kann sogar sagen, rein städtische Gebiete die hauptsächlichsten Ruhrherde. Zum Problem der E-Ruhr ist noch zu sagen, daß nach einer Zusammenstellung von Dr. Karl Hübinger die mir vorliegt und die ich durch weitere Umfragen noch erweitert habe, die Behauptung aufgestellt werden kann, daß die Ruhr den Anstieg im Jahre 1936—1937 nicht gehabt hätte, wenn die sonstigen bisher in Deutschland vorkommenden Ruhrtypen, also im wesentlichen Shiga-Kruse, Flexner- und Y-Ruhr hauptsächlich als Erreger in Betracht gekommen wären, mit anderen Worten, der seit dem Jahre 1934 zu beobachtende Anstieg der gemeldeten Ruhrfälle von 2100 im Jahre 1934 auf 7500 im Jahre 1937 geht ausschließlich auf Rechnung der neu aufgetretenen E-Ruhr (Typ Kruse-Sonne).

Es ist mir leider nicht möglich, im Rahmen dieses kurzen Vortrages näher auf Einzelheiten einzugehen, insbesondere wäre es sehr interessant gewesen, sich mit dem Ablauf der Ruhr während des Krieges und kurz nachher zu befassen.

Genauere Angaben darüber, sowie Einzelheiten über den Ruhrablauf in den einzelnen Gebieten habe ich vor, in einer größeren Arbeit zusammenzustellen und ich bitte Sie, die heutigen Ausführungen als eine vorläufige Mitteilung zu werten.

3. W. Kollath, G. Poetschke und Maria Schraep (Rostock):

Eine Kruse-Shiga-Ruhrepidemie in Mecklenburg [1]).

Die Bazillenruhr vom Typ Kruse-Shiga ist seit dem Weltkrieg in Deutschland so selten geworden, daß eine umfangreiche Epidemie allein aus diesem Grunde eine Bearbeitung verdient.

Unser Tatsachenmaterial entstammt zum größten Teil unseren eigenen Erhebungen; daneben konnten wir Unterlagen verwerten, die wir dem Staatlichen Gesundheitsamt des befallenen Kreises, dem Krankenhause Neubrandenburg und der Gauamtsleitung der NSV in Schwerin verdanken.

An dieser Stelle kann nur ein kurzer Bericht über die Epidemie gegeben werden. Eine ausführliche Darstellung soll gleichzeitig mit einer Bearbeitung des pommerschen Teiles der Epidemie durch Keller in „Veröffentlichungen aus dem Gebiet des Gesundheitswesens" erscheinen.

Beginn und Ausbreitung der Epidemie:

Die Epidemie spielte sich in den Monaten August und September 1938 in dem mecklenburgischen Kreis Malchin und dem pommerschen Kreis Demmin ab. Im befallenen Gebiet standen 95 Ortschaften unter amtsärztlicher und bakteriologischer Kontrolle. Sichere Ruhrfälle wurden in 4 mecklenburgischen Dörfern (Fahrenholz, Röckwitz, Kriesow und Tüzen) und in 3 pommerschen Dörfern (Prüzen, Hohenbrünzow und Barkow) beobachtet.

1) Aus dem Hygiene-Institut der Universität Rostock (Direktor: Prof. Dr. Werner Kollath).

Es handelt sich um ein rein ländliches Gebiet mit besonders schlechten Verkehrsverhältnissen. Diese bedingten eine Transportzeit von fast zwei Tagen für das Untersuchungsmaterial. Es nimmt daher nicht wunder, daß die bakteriologischen Befunde für Ruhr anfangs negativ blieben. Das Untersuchungsmaterial wurde, da der Wohnsitz der Aerzte in verschiedenen Verwaltungseinheiten lag, verschiedenen Untersuchungsämtern (Rostock bzw. Stettin) zugeleitet. Dieser unglücklichen Dezentralisation der ärztlichen Versorgung muß ein guter Teil der Schuld für die lokale Verbreitung und die späte Erkennung zugeschrieben werden. Die Diagnose blieb, da sich die einzelnen Aerzte auf den negativen bakteriologischen Befund stützten, längere Zeit hindurch „Sommerdiarrhöe". Einige der Kranken wurden in Krankenhäuser verlegt; eines davon äußerte den Verdacht auf „Amöbenruhr". Nun erst, fast 4 Wochen nach Beginn der ersten Erkrankungen, wurde das Medizinaluntersuchungsamt Rostock zwecks Stellung der Diagnose zugezogen. Obwohl das klinische Bild gegen Amöbenruhr sprach, wurde zur Sicherung der Diagnose und zwecks Vermeidung eines etwaigen endemischen Herdes Herr Dr. Westphal vom Tropeninstitut Hamburg zugezogen. Er fand zwar in mehreren Stühlen verschiedene Amöben, aber keine Amoeba histolytica. Kollath stellte vielmehr auf Grund des klinischen Bildes die Diagnose Kruse-Shiga-Ruhr, die auch bald serologisch und bakteriologisch bestätigt werden konnte. Um die akute Gefahr der Weiterverbreitung der Krankheit zu beseitigen, schlug er die sofortige Errichtung eines Barackenlazarettes in Stavenhagen vor, die dank der Unterstützung der Medizinalverwaltung durch den Gauleiter Friedrich Hildebrandt, die NSV und das NSKK in wenigen Tagen durchgeführt wurde.

Die Epidemie erhält ein besonderes Interesse durch die Tatsache, daß in zwei von den befallenen Dörfern ungarische Wanderarbeiter in sogenannten Schnitterkasernen untergebracht waren. Der erste Krankheitsfall war ein Kind, das seit 4 Tagen in der Schnitterkaserne von Fahrenholz zu Besuch weilte. Bald darauf erkrankten dessen Bruder und zwei Ungarn. Bei beiden Kindern wurden, als sie bald darauf schwer krank nach Hamburg zurückgebracht wurden, dort Dysenteriebakterien vom Typ Kruse-Shiga gefunden. Da in Hamburg vor dem Besuch der Kinder in Fahrenholz keine Gelegenheit bestanden hat, eine Kruse-Ruhr zu erwerben, möchten wir die Infektionsquelle mit Sicherheit bei den Ungarn in Fahrenholz suchen, besonders weil die Kruse-Shiga-Ruhr in Ungarn endemisch ist.

Sehr bald wurden auch die anderen Dörfern befallen. Die zeitlichen und örtlichen Verhältnisse sprechen dafür, daß die Seuche nach Kriesow durch den Briefträger, der sich selbst in Fahrenholz infiziert hatte, und nach Röckwitz durch die Ungarn, die dort die katholische Kirche besuchten, gebracht worden ist. Hier wurden vorwiegend katholische Einwohner befallen, so daß die Annahme, das Weihwasserbecken sei die erste Quelle der Ausbreitung geworden, nicht unberechtigt erscheint.

Die Organisation der Bekämpfung war folgende:

1. Sämtliche Ruhrkranken und Ruhrverdächtigen wurden, soweit sie nicht schon in anderen Krankenhäusern lagen, in das Seuchenlazerett Stavenhagen gelegt, das von der Medizinischen Universitätsklinik Rostock ärztlich betreut wurde.

2. Alle Stuhlproben des gesamten mecklenburgischen und pommerschen Verdachtsgebietes wurden vom Seuchenlaboratorium Stavenhagen, das vom Medizinaluntersuchungsamt Rostock errichtet und geleitet wurde, untersucht. Mit Hilfe der Staatspolizei und des NS-Kraftfahrkorps wurde ein um-

fassender Expreßdienst eingerichtet, wodurch sehr kurze Transportzeiten für die Stuhlproben erreicht wurden.

3. Die Blutproben für die Gruber-Widalsche Reaktion wurden je nach der Landeszugehörigkeit in den Untersuchungsämtern Rostock bzw. Stettin bearbeitet.

Die bakteriologischen Ergebnisse:

Es wurden insgesamt 2272 Stuhlproben untersucht und 95 Ortschaften erfaßt. Bei 1138 Personen wurden keinerlei Dysenteriebakterien gefunden, bei 31 Personen wurden Kruse-Shiga-Bazillen gefunden, bei 6 Personen Y-Ruhrerreger. Bei den Y-Fällen handelte es sich bis auf zwei Fälle um Dauerausscheider bzw. Bazillenträger, bei den Kruse-Fällen immer um Kranke. Leider konnten bei keinem der Ungarn, von denen nur wenige erkrankten, Kruse-Shiga-Bakterien gefunden werden: klinisch und serologisch waren jedoch mehrere sichere Fälle unter ihnen.

Die serologischen Ergebnisse:

Die Gruber-Widalsche Reaktion wurde bei allen Patienten und bei allen Einwohnern der befallenen mecklenburgischen Dörfer angestellt (außer in Tüzen, wo nur die Umgebung des einen Krankheitsfalles und des einen Verdachtfalles untersucht wurde).

Die Agglutination wurde mit Dysenterieerregern vom Typ Kruse-Shiga und E geprüft. da der Typ E in Mecklenburg besonders verbreitet ist. Eine weitergehende Prüfung war aus technischen Gründen leider nicht möglich. Tabelle 1 gibt das Gesamtergebnis der serologischen Untersuchungen wieder. Eine genauere Analyse der Ergebnisse ist an diesem Ort leider nicht möglich.

Tabelle I.
Gesamtergebnis der serologischen Untersuchungen.
(Die Dorfer Fahrenholz, Rockwitz. Kriesow. Tüzen, Krankenhaus Neubrandenburg und Seuchenlazarett Stavenhagen.)

	Ruhrkranke	Ruhrverdacht	Gesunde und Ansteckungs-verdachtige	Gesamtzahl
Shiga + E —	81	13	124	218
Shiga + E —	4	—	4	8
Shiga — E +	—	1	6	7
Shiga — E —	41	25	190	256
Gesamt	126	39	324	489

Die Bedeutung der Umgebung des Einzelfalles:

Es wurde jede mittelbare oder unmittelbare Ansteckungsmöglichkeit als „kranke Umgebung" gewertet. Tabelle II gibt die dabei gefundenen Ergebnisse wieder. Sie zeigt, daß für alle Kranken und fast alle Verdachtsfälle eine mögliche Ansteckungsquelle in der Umgebung gefunden werden konnte. Das Wasser scheidet damit als Infektionsträger aus. Die untersuchten Brunnen wiesen zwar fast durchweg Colibakterien auf, nie aber Ruhrerreger.

Erkrankungen und Todesfälle:

In Mecklenburg wurden insgesamt 145 Ruhrerkrankungen und 41 Verdachtfälle während der Epidemie bekannt. Es starben davon 20 Personen. Die Letalität betrug damit 13,99 Proz. (bzw. 10,93 Proz., wenn man auch die

Tabelle II.
Bedeutung der Infektiosität der Umgebung des Einzelfalles.

Ort	Kranke Umgebung			Gesunde Umgebung		
	Ruhrkranke	Ruhrverdacht	Ansteckungsverdacht	Ruhrkranke	Ruhrverdacht	Gesunde
Fahrenholz	85	20	77	—	—	2
Röckwitz	39	9	58	3	—	85
Kriesow	17	7	58	—	4	65
Gesamt	141	36	193	3	4	152

Verdachtsfälle in die Rechnung einbezieht). Die Verstorbenen gehörten zu $^3/_4$ dem jugendlichen Alter (1.—20. Lebensjahr) an. Unter den Verstorbenen befanden sich 13 Personen männlichen und 7 Personen weiblichen Geschlechts. Unter den jugendlichen Personen der Todesfälle befinden sich 3 Geschwisterpaare. Die einzelnen Paare starben jeweils am gleichen Tage.

Das Verhältnis der Erkrankungen zu den Todesfällen war
in Fahrenholz 6,5 : 1
in Röckwitz 6,8 : 1
in Kriesow 17,0 : 1.

Dieses Ergebnis erscheint uns besonders bemerkenswert, weil in Kriesow jeder Kranke sofort nach Beginn der Erkrankung in ein Krankenhaus verbracht wurde. Dies war bei den beiden anderen Ortschaften nicht der Fall. Dort stiegen auch die Erkrankungsziffern auf fast genau doppelt, bzw. viermal so hohe Werte. Diese Tatsachen scheinen uns ein deutlicher Beweis für die Berechtigung der Forderung, jeden Ruhr-, Typhus- und Paratyphuskranken in einer Krankenanstalt unterzubringen. Der aktiven Immunisierung der Bevölkerung von Kriesow mit Dysbakta können wir eine wesentliche Bedeutung für die geschilderten Tatsachen beilegen, obwohl sie relativ spät einsetzte.

Vorschläge für eine leistungsfähigere Ruhrbekämpfung:

Die geschilderte Epidemie hat gezeigt, daß sich die praktischen Aerzte bei der Ruhrdiagnose zu stark vom negativen bakteriologischen Befund leiten lassen. Wenngleich diese Tatsache unerfreulich ist, so glauben wir doch, daß ihr Rechnung getragen werden muß[1]). Das Medizinaluntersuchungsamt Rostock wird daher in Kürze ein fahrbares Laboratorium in Dienst stellen, das bei allen Epidemien und besonders bei allen Ruhrverdachtsfällen die Proben ambulant entnehmen und verarbeiten soll. Ferner möchten wir eine besonders eingehende gesundheitliche Ueberwachung und Auswahl der ausländischen Wanderarbeiter fordern.

Zusammenfassung.

1. Es wurde eine umfangreiche Kruse-Shiga-Ruhrepidemie beschrieben, die sich unter besonders ungünstigen Verkehrs- und Versorgungsverhältnissen in einem ländlichen Gebiet abspielte.

2. Als Infektionsquelle wurden ungarische Wanderarbeiter wahrscheinlich gemacht.

1) Einen wesentlichen Fortschritt durfte die neue Ministerialverordnung vom 1. Dezember 1938 bringen, nach der auch Ruhrverdacht meldepflichtig ist.

3. Es wurde nachgewiesen, daß die Infektion überwiegend von Mensch zu Mensch weitergetragen wurde. Das Trinkwasser konnte als Infektionsträger ausgeschlossen werden. In einem Dorfe schien das Weihwasserbecken als Infektionsvermittler mitgewirkt zu haben.

4. Die Bedeutung einer strengen Isolierung der Kranken konnte erhärtet werden.

5. Es werden Vorschläge für eine wirksamere Ruhrbekämpfung gemacht.

4. H. Peter und T. Wohlfeil (Berlin):

Zur Epidemiologie und Diagnose der Ruhr, insbesondere der E-Ruhr [1]).

Bei der Durchsicht des bisher nicht veröffentlichten Zahlenmaterials der Seuchenberichte aus den einzelnen Regierungsbezirken und Ländern für das Jahr 1937. die uns vom Reichsministerium des Innern zur wissenschaftlichen Bearbeitung zur Verfügung gestellt wurden, ergab sich beim Vergleich mit den früheren Berichten für die Ruhr ein epidemiologisch wechselvolles Bild. Seit 1935 liegen zusammenfassende Berichte für das gesamte Reichsgebiet vor. Von diesem Zeitpunkt an bis 1937 ist eine Zunahme der sanitätspolizeilich gemeldeten Ruhrerkrankungsfälle einwandfrei festzustellen (Tab. I u. II) 1938 stiegen die Zahlen nicht weiter an. Im Vergleich zu anderen Infektionskrankheiten konnte vermerkt werden, daß die Ruhr 1937 durchschnittlich 2½mal häufiger als Typhus vorkam. Die Erkrankungsziffern der Diphtherie lagen demgegenüber durchschnittlich 19mal höher als die der Ruhr. Dabei müssen wir kritisch hinzufügen, daß das sanitätspolizeilich gemeldete Zahlenmaterial über Ruhr wahrscheinlich lange nicht so erschöpfend ist wie für Diphtherie und Typhus. Viele leichte Ruhrfälle werden nicht vom Arzt gemeldet, oft auch die bakteriologischen und serologischen Untersuchungsmethoden zur Klärung der Diagnose in der Praxis nicht genügend ausgenutzt. Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß die Ruhr noch weitaus häufiger vorkommt, als die sanitätspolizeilich gemeldeten Zahlen vermuten lassen.

Untersucht man die Verteilung der Ruhr auf einzelne Altersklassen, so ist einwandfrei zu erkennen, daß die Ruhr ebenso wie die Diphtherie und ganz anders als der Typhus zur Zeit eine besonders häufige Erkrankung des kindlichen und jugendlichen Alters ist (Tab. I u. II). Wir haben den Anteil der 1—5jährigen an der Gesamtbevölkerung mit der Zunahme der Ruhrerkrankungen in Beziehung gesetzt und gefunden, daß die Zunahme der Erkrankungen mit der Bevölkerungsvergrößerung dieser Altersklassen wenigstens vom Jahre 1935 bis 1937 parallel geht.

Wichtig ist die Tatsache, daß der Zunahme der Erkrankungshäufigkeit eine Abnahme der Letalität gegenübersteht. Die höchsten Letalitätsziffern findet man bei Kindern unter 1 Jahr und bei Erwachsenen über 60 Jahren.

1) Aus der Seuchenabteilung des Instituts Robert Koch, Berlin (Abteilungsleiter: Prof. Dr. T. Wohlfeil).

Tabelle I.

Art der Erkrankung	Auf 10000 der Bevolkerung erkrankten im Jahre 1937						
	unter 1 Jahr	1—5 Jahre	6—14 Jahre	15—19 Jahre	20—59 Jahre	60 Jahre und mehr	im Durchschnitt Deutschlands
Ruhr . . .	2,57 (2,17-3,05)	3,42 (3,18-3,67)	2,80 (2,65-2,97)	1,16 (1,01-1,32)	0,52 (0,48-0,56)	0,35 (0,31-0,43)	1,13
Diphtherie	15,6	71,8	87,0	22,8	3,5	0,24	21,7
Typhus .	0,12	0,46	0,58	0,8	0,46	0,13	0,45

Tabelle II.
Ruhrerkrankungen und Sterbefälle in Deutschland
(ohne Land Oesterreich und Sudetengau).

Jahr	Anzahl der Ruhrerkrankungen		Anzahl der Sterbefälle an Ruhr		Zahl der Kinder in Tausend		v. H.-Satz der Kinder 1—15 Jahre der Gesamtbevölkerung
	absolut	auf 10000 der Bevolkerung	absolut	Letalität v. H.	1—5 Jahre	1—15 Jahre	
1935	3457	0,52	142	4,2	4750	15 793	24,0
1936	5055	0,75	153	3,0	4890	16 129	23,6
1937	7632	1,11	178	2,3	5243	15 866	23,5
1938	7400	1,01	—	—	5533	15 847	23,3

Bei Klein- und Schulkindern verläuft die Ruhr dagegen bei hoher Morbidität in der Regel gutartig (Tab. III). Dies gilt für Preußen, die übrigen Länder und für den gesamten Durchschnitt Deutschlands.

Tabelle III.
Ruhrletalität in den verschiedenen Altersklassen.

	Altersklassen						
	unter 1 Jahr	1—5 Jahre	6—14 Jahre	15—19 Jahre	20—59 Jahre	60 Jahre und mehr	alle
Preußen							
Erkrankungen	207	1069	789	181	942	162	3350
Sterbefälle .	16	33	10	8	43	17	127
Letalität . .	7,73 v. H.	3,09 v. H.	1,27 v. H.	4,42 v. H.	4,56 v. H.	10,49 v. H.	3,79 v. H.
ihre Schwankung	3,8—5,2 v. H.	1,8—5,1 v. H.	0,5—3,1 v. H.	1,6—11,7 v. H.	2,9—7,1 v. H.	5,3—20,0 v. H.	2,9—4,9 v. H.
übriges Deutschland							
Erkrankungen	105	666	1901	406	1070	134	4282
Sterbefälle .	11	8	6	3	14	9	51
Letalität . .	10,48 v. H.	1,20 v. H.	0,32 v. H.	0,74 v. H.	1,31 v. H.	6,72 v. H.	1,10 v. H.
ihre Schwankung	4,4—22,8 v. H.	0,4—3,3 v. H.	0,1—1,0 v. H.	0,2—3,4 v. H.	0,6—2,8 v. H.	2,6—16,3 v. H.	0,8—1,8 v. H.
ganz Deutschland							
Erkrankungen	312	1735	2690	587	2012	296	7632
Sterbefälle .	27	41	16	11	57	26	178
Letalität . .	8,65 v. H.	2,36 v. H.	0,59 v. H.	1,87 v. H.	2,83 v. H.	8,78 v. H.	2,33 v. H.
ihre Schwankung	5,0—14,6 v. H.	1,5—3,7 v. H.	0,3—1,2 v. H.	0,8—4,5 v. H.	1,9—4,2 v. H.	5,0—15,0 v. H.	1,9—2,9 v. H.

Bezüglich der Letalität bei den einzelnen Ruhrtypen konnte festgestellt werden, daß diese bei Erkrankungen durch Bazillen der Flexner-Gruppe weitaus größer ist als bei der E-Ruhr (Tab. IV). Wenn auch die Zahlen der verglichenen Fälle nur klein sind, und die errechneten Werte daher keine allgemeine Gültigkeit haben, so ist der Unterschied nicht verkennbar und statistisch gesichert. Wie der Vortrag von Kollath und Mitarbeitern zeigte, ist die Shiga-Kruse-Ruhr in der Regel noch weitaus bösartiger als die Flexner-Ruhr.

Ein Unterschied zwischen der Mortalität bei Einzelfällen und bei Epidemien konnte nicht festgestellt werden, wie die großen Schwankungen der Prozentzahlen (nach den Formeln von Prigge und v. Schelling berechnet) zeigen (Tab. IV).

Tabelle IV.

	Epidemie	Einzelfalle	Verschiedene Ruhrtypen	
			Flexner-Y-Gruppe	E-Ruhr
Erkrankungen . .	514	1811	41	292
Sterbefälle . . .	12	71	3	5
Letalität	2,3 v. H.	3,92 v. H.	19,51 v. H.	1,71 v. H.
ihre Schwankung .	1,0—5,3 v. H.	2,8—5,5 v. H.	7,3—42,7 v. H.	0,5—1,8 v. H.

Die einzelnen Ruhrtypen verteilen sich auf die Gesamtzahl der Erkrankungen derart, daß die E-Ruhr mit 84,3 Proz. an Häufigkeit die Erkrankungen durch Bazillen der Flexner-Y-Gruppe mit 11,2 Proz. bei weitem übertrifft. Erkrankungen durch die übrigen Ruhrbazillentypen treten demgegenüber völlig in den Hintergrund. In einem gewissen Teil von Erkrankungen ist eine Differenzierung der Ruhrerreger nicht durchgeführt worden.

Das Vorkommen der einzelnen Ruhrtypen ist landschaftlich verschieden: In Ostpreußen kamen z. B. 1937 überwiegend Erkrankungen durch Flexner-Bazillen und nur vereinzelte durch E-Ruhrbazillen vor. Aehnliches gilt für die Provinz Schlesien, wo allerdings schon mehr E-Ruhrerkrankungen auftraten. Im gesamten übrigen Deutschland findet man heute fast ausschließlich E-Ruhrerkrankungen und nur noch vereinzelte durch Flexner-Bazillen. Hierzu sei bemerkt, daß Sartorius vor etwa 8 Jahren in Westdeutschland (Münster) und auch nach Befunden aus anderen Teilen Deutschlands vorwiegend Erkrankungen durch A-D-H-Typen nachweisen konnte.

Für die geographische Häufung der Ruhr ist bemerkenswert, daß vor allem im Bereich des Elbestromes (Dresden, Bautzen, Magdeburg, Hamburg-Altona) eine besonders hohe Erkrankungsziffer gefunden worden ist: 56,5 auf 100000 gegenüber 5,9 auf 100000 im übrigen Deutschland. Auch in den Regierungsbezirken und Städten, die um die übrigen großen Stromgebiete Deutschlands (Oder, Mittellandkanal, Rhein, Jade, Unterweser, Donau) gruppiert sind, trat die Ruhr besonders häufig auf. Es scheint demnach das Wasser großer Ströme in einer gewissen epidemiologischen Beziehung zur Ruhrhäufigkeit zu stehen, ohne daß hier Näheres darüber gesagt werden kann. Die Häufigkeit der eigentlichen Wasserinfektionen durch Ruhrbazillen ist demgegenüber sehr gering. Im Jahr 1937 konnte eine Wasserinfektion nur in 19 Fällen ermittelt werden.

Da die Ruhr in dicht besiedelten Regierungsbezirken besonders häufig zu sein scheint, wurde versucht, eine Beziehung zwischen der Ruhrhäufigkeit und der Wohndichte zu ermitteln. Diese ließ sich jedoch statistisch nicht exakt errechnen. In 23 Regierungsbezirken, Städten und Ländern, die für

eine solche Korrelationsrechnung geeignet waren, konnte ein Korrelationskoeffizient für die Ruhrhäufigkeit und die Wohndichte von nur + 0,22 errechnet werden.

Die praktische Ruhrdiagnostik muß der Tatsache der Häufung der Ruhr im allgemeinen und besonders der E-Ruhr Rechnung tragen. Wir führen daher seit November 1936 auf der Seuchenabteilung des Instituts Robert Koch bei jedem verdächtigen, aus Stuhl und Urin isolierten Keim neben der Probeagglutination mit den üblichen Seren der T.P.E-Gruppe auch die mit E-Ruhr-Serum durch. Wenn hierbei auch mancher Stamm von Coli imperfectum mit übertriebener Sorgfalt verarbeitet wird, lohnt sich diese Mühe doch, denn die E-Ruhr-Ausbeute ist seitdem stark gestiegen. Außerdem wird seit Ende 1936 bei jedem Ruhrverdacht die Gruber-Widalsche Reaktion neben der auf andere Ruhrerreger auch auf E-Ruhr angestellt. Sie ist seitdem bis heute 1030mal ausgeführt worden und war 67mal positiv. 65 dieser Fälle konnten nur serologisch festgestellt werden, da Stuhl nicht eingesandt war (38 Fälle) oder keine Bazillen darin nachzuweisen waren (27 Fälle). Diesen 65 rein serologisch ermittelten E-Ruhr-Erkrankungen stehen 89 nur durch Bazillennachweis erkannte Fälle gegenüber. Das bedeutet, daß durch die Gruber-Widalsche Reaktion allein 41,1 Proz. aller E-Ruhrerkrankungen festgestellt wurden. Nur 2,6 Proz. wurden serologisch und durch Bazillennachweis in Stuhl oder Urin festgestellt (Tab. V).

Tabelle V.
E-Ruhr-Diagnostik am Institut Robert Koch Berlin, vom 1. November 1936 bis 20. Marz 1939.

Stuhl- und Urinuntersuchungen		72500
darunter E-Ruhr 91mal	= 0,125 v. H.	
Gruber-Widal auf E-Ruhr angesetzt		1030mal
davon positiv 67 Fälle	= 6,5 v. H.	
Gesamtzahl der E-Ruhr-Fälle		158
davon nur durch Bazillennachweis	56,3 v. H.	
nur durch Gruber-Widal	41,1 v. H.	
und mit beiden Verfahren erkannt	2,6 v. H.	

Eine weitere Verbesserung und Beschleunigung der Ruhrdiagnostik erzielen wir durch ein neuartiges kulturelles Verfahren. Wohlfeil hat im Rahmen seiner fermentchemischen Arbeiten versucht. die kulturelle Diagnostik der T.P.E.-Gruppe und der Ruhrgruppe durch Zusatz fermentaktivierender und wachstumsbeschleunigender Mittel zu beschleunigen. Ueber weitere Einzelheiten wird von T. Wohlfeil an anderer Stelle berichtet werden. In diesem Zusammenhange wurde der Zusatz eines Hefeextraktes geprüft, dessen Wirksamkeit, abgesehen von seinen wachstumsfördernden Faktoren (Weichardt) hauptsächlich auf seinem Co-Zymasegehalt beruhen dürfte. Brauereihefe wurde mit $^1/_{15}$ molarer primärer (d. h. saurer) Kaliumphosphatlösung 1 Stunde bei 80° extrahiert, zwecks Sterilisation kurz aufgekocht und derart als sterile, filtrierte, Co-Zymaselösung (Myrbäck) aufbewahrt. Für diese Untersuchungen haben wir jedoch nicht die Barsiekow-Zuckerlösungen, sondern einfache 1proz. Zuckerlösungen, die verschieden stark phosphatgepuffert und kolorimetrisch auf $p_H = 7,0$ eingestellt waren, verwendet, da bei Barsiekow-Lösungen die entstehenden Eiweißspaltprodukte die Reaktion unübersichtlich machen können (Wohlfeil; Frei). Bemerkenswert ist, daß die Ruhrbazillen in der Phosphatzuckerlösung allein nicht wachsen, wohl aber nach Zusatz von Hefeextrakt, der vorher ebenfalls auf $p_H = 7,0$ eingestellt sein muß (4,5 ccm Phosphatzuckerlösung + 0,5 ccm

neutralisierten Hefextrakt). Ob das Wachstum allein auf die Zerlegung der Dextrose infolge der aktivierenden Wirkung der Co-Zymase oder außerdem auch auf die geringe Menge N-haltiger Bestandteile des Hefeextraktes zurückzuführen ist, müssen wir einstweilen offenlassen.

Bei der Prüfung stellte sich heraus, daß sich das Verhalten der Ruhrbazillen in Laktose- und Saccharose-Lösungen + Hefeextrakt nicht gegenüber dem in gewöhnlichen Barsiekow-Lösungen unterscheidet. Bei der Dextrose aber traten so weitgehende Unterschiede auf, daß sie zur Differenzierung der einzelnen Ruhrtypen und in Verbindung mit der übrigen bunten Reihe zur Beschleunigung der Diagnose Verwendung finden konnten (Tab. VI). Die E-Ruhr zeigte selbst in stark gepufferten (1/15 molaren) Lösungen ein starkes Säurebildungsvermögen aus Traubenzucker: sogenannte Strong- und Y-Bazillen bilden die gleiche Säuremenge bei derselben Bebrütungszeit und Keimmenge erst in etwa halb so stark gepufferter Lösung (1/30 mol.), D und H-Bazillen erst in 1/45 molar gepufferter Lösung. Bei A-Bazillen ist erst in 1/60 molar gepufferter Lösung eine deutliche Säurebildung nachzuweisen, während sie bei Kruse-Shiga-Bazillen auch dann nur sehr schwach war. Schmitz-Bazillen verändern die Phosphat-Co-Zymase-Traubenzuckerlösung ebensowenig wie wie Kruse-Shiga-Bazillen.

Tabelle VI.

pH-Werte der 1/15 bis 1/60 molar Phosphat-gepufferten 1proz. Traubenzucker-Co-Zymase-Losung nach 24 Std. Bebrütung.

	1/15	1/30	1/45	1/60
E-Ruhr	6,0	5,7	5,5	5,0
Strong	6,5	6,0	5,7	5,3
Y	6,7	6,0	5,8	5,7
D, H} Flexner-Y-	6,8	6,2	6,0	5,7
A } Gruppe . .	7,0	6,8	6,7	6,3
Kruse-Shiga . .	7,0	6,8	6,7	6,5
Schmitz	7,0	6,8	6,7	6,7

Die Säurebildung wurde dabei kolorimetrisch (durch Nitrophenol und Merckschen Indikator) und durch den Umschlag zugesetzter verschiedener Indikatoren wie Lackmus und Methylrot gemessen. Es handelt sich bei diesen Unterschieden nicht um qualitative, sondern um quantitative Differenzen. Daher war es notwendig, zuerst zwecks Auffindung der obigen Regeln mit der gleichen Keimzahl (etwa 1/100 Oese), mit der gleichen Bebrütungszeit (24 Std.) und mit einer gleich stark gepufferten Lösung zu arbeiten (1/60 molar). Unter diesen gleichen Versuchsbedingungen sind die aufgezeigten Unterschiede diagnostisch verwertbar. So sind z. B. mit Lackmuslösung versetzte Röhrchen bei Beimpfung mit E-Ruhrbazillen nach 24 Std. hell ziegelrot (++), mit Flexnerstämmen beimpfte Röhrchen je nach dem Typ rotblau bis rot (± bis +) und mit Shiga- und Schmitzbazillen beschickte Röhrchen fast unverändert.

Mit diesem Verfahren gelang es mehrfach, Rauhformen von E-Ruhrbazillen schon 24 Std. nach der Isolierung nach ihrem Verhalten in der bunten Reihe und in der Co-Zymase-Zuckerlösung zu erkennen und das Ergebnis hinauszugeben, bevor die Umwandlung in Glattformen und die serologische Prüfung gelungen war. Diese bestätigte dann das Anfangsergebnis.

Die Methode wurde an allen Ruhrstämmen unserer Sammlung und an sämtlichen frisch isolierten Stämmen (insgesamt 65 Stämmen) nachgeprüft. Dabei zeigten sich innerhalb der einzelnen Gruppen nur geringe Schwan-

kungen. Ganz vereinzelte, sich atypisch verhaltende Stämme wiesen stets auch sonstige andere Anomalien serologischer oder kultureller Art auf. Dieser Frage wird noch weiter nachgegangen. Es wurde auch versucht nachzuweisen, ob Unterschiede zwischen frisch isolierten Stämmen und alten Sammlungsstämmen bestünden, oder ob sich Keime, die lange Zeit nicht überimpft worden waren, anders verhielten als frisch isolierte. Prinzipielle allgemeingültige Unterschiede wurden dabei nicht aufgedeckt. Weiter wurde festgestellt, daß Schwankungen in der Keimmenge um etwa das 8fache noch eindeutig vergleichbare Ablesungen ermöglichten.

Wie gezeigt wurde, scheint mit dem neuen Verfahren eine Methode gegeben zu sein, die bei weiterem Ausbau eine Bereicherung der Differentialdiagnostik der Ruhrkeime und anderer Erreger zu werden verspricht.

Schrifttum.

1. Frei, W., Ergeb. d. Allg. Path. u. path. Anat. **31**, 52 u. 58 (1936). — 2. Kollath, W., Pietschke, G., u. Schraep, M., dieser Bericht. — 3. Myrback, K., Tabulae Biol. **14**, 110 (1937). — 4. Prigge, R., Naturwiss. **25**, 169/170 (1937). — 5. Sartorius, F. u. Freese, M., Zbl. Bakter. I Orig. **138**, 189 (1937). — 6. Sartorius, F., u. Reploh, H., Zbl. Bakter. I Orig. **126**, 10 (1932). — 7. Sartorius, F., Z. Immun.forschg **83**, H. 5/6. (1934). — 8. v. Schelling, H., Naturwiss. **25**, 699 (1937) u. Arb. a. d. Staatl. Inst. f. exper. Therap. Frankfurt a. M. 1939, H. 37.

5. H. David und A. Schirl (Wien):

Ueber Ruhrerkrankungen bei Menschenaffen [1]).

Im Monat August erhielt vor einigen Jahren [2]) der Wiener Tiergarten Schönbrunn aus einer Tierhandlung in H. zwei junge Kamerunschimpansen. Ob es sich um frisch importierte Tiere gehandelt hat oder nicht, blieb uns unbekannt. 6 Tage nach ihrer Einstellung erkrankten die Tiere, angeblich infolge eines Diätfehlers. Sie zeigten bei sehr schlechtem Allgemeinbefinden und Temperaturen um 38° heftige Durchfälle mit schleimigen und blutigen Beimengungen, sowie schwere Tenesmen. Die parasitologische Untersuchung der Fäzes ergab einen negativen Befund, eine bakteriologische Untersuchung unterblieb. Die versuchte symptomatische Behandlung blieb erfolglos; die Tiere starben nach einwöchiger Krankheit. Die Obduktion erfolgte in der Prosektur des Rudolfsspitals (Prof. Priesel); ein Sektionsbefund liegt nicht vor. Es wurden uns jedoch zwei aus den Schimpansen gezüchtete Stämme zur näheren Bestimmung mit der Angabe überlassen, daß es sich um Mikroorganismen handelt, welche die biologischen Eigenschaften der Dysenterieerreger besitzen und in polyvalentem Pseudodysenterieserum agglutiniert werden. Mit den Stämmen wurde, gleichfalls von Prof. Priesel, eine Vakzine hergestellt, womit zwei Schimpansen und zwei Gibbons, welche wegen der engen Nachbarschaft mit den gestorbenen Schimpansen besonders gefährdet erschienen, in dreitägigen Intervallen mit 100, 500 und 1000 Millionen Keimen subkutan geimpft wurden. Außerdem erhielten die Tiere polyvalentes Dysenterieserum einverleibt. Trotzdem gingen die Erkrankungen unter den Affen weiter. Im Verlaufe von drei Monaten erkrankten die schutzgeimpften Tiere,

1) Aus dem Veterinärbakteriol. Institut der Tierärztlichen Hochschule Wien (Direktor: Prof. Dr. H. David).

2) Eine frühere Veröffentlichung unterblieb aus äußeren Gründen.

sowie ein nicht vorbehandelter Schimpanse und ein Orang-Utan an mehr oder minder schweren Durchfällen bei schlechtem Allgemeinbefinden. Zur Zeit dieser Erkrankungen traten auch bei einem Wärter, welcher die erkrankten Tiere zu betreuen hatte, Durchfälle auf. Die beiden Gibbons starben und zeigten eine diffuse Rötung der Darmschleimhaut und eine schwach vergrößerte Milz (Befund des Pathologischen Institutes der Tierärztlichen Hochschule). Aus den Darmlymphknoten der Tiere wurden „milchzuckernegative“ Mikroorganismen isoliert, die uns zur weiteren Bestimmung und zur Ergänzung unserer Befunde überlassen wurden. Die parasitologische Untersuchung des Darminhaltes der beiden gestorbenen Gibbons ergab bei einem einen starken Befall mit Strongyloides, bei dem anderen reichlich Flagellaten. (Befund der Lehrkanzel für Parasitologie der Tierärztlichen Hochschule.) Die restlichen Tiere (drei Schimpansen und ein Orang-Utan) wurden wieder gesund. Zur bakeriologischen Untersuchung erhielten wir zahlreiche Kotproben der erkrankten Tiere. Die Proben wurden in der Regel körperwarm auf Endo- und Gassnerplatten ausgestrichen. Nach dem bereits vorliegenden Befund sammelten wir hauptsächlich diejenigen Stämme, welche milchzuckernegativ waren und in polyvalentem Dysenterieserum agglutiniert wurden. Aus den Fäzes aller kranken Tiere konnten gleichartige Keime isoliert werden. Es lagen vor: gramnegative, unbewegliche und unbegeißelte Stäbchen, welche Traubenzucker und Mannit ohne Gasbildung säuerten, dagegen Milchzucker, Saccharose, Dulzit und Maltose unbeeinflußt ließen. Auffallend war, daß die Kolonien auf „Endo“ meist in der ersten Generation einen leicht rötlichen Stich aufwiesen, der aber bei den weiteren Ueberimpfungen wieder verschwand. Indol wurde nur unregelmäßig gebildet. Gleich verhielten sich auch die Stämme, welche von anderer Seite aus den beiden Schimpansen und Gibbons gezüchtet worden waren. Insgesamt standen uns 10 morphologisch und biologisch gleiche Stämme zur Verfügung, und zwar: Kotstämme von den überlebenden drei Schimpansen und dem Orang-Utan, sowie der beiden gestorbenen Gibbons, und außerdem je zwei Stämme aus den Darmlymphknoten oder dem Darminhalt der gestorbenen Schimpansen und Gibbons.

Die Gleichheit der Stämme ergab sich nicht nur aus den übereinstimmenden morphologischen und biologischen Eigenschaften, sondern auch aus ihrem einheitlichen serologischen Verhalten. 4 mit verschiedenen „Affenruhrstämmen“ hergestellte Antisera wurden von jedem einzelnen Stamm restlos abgesättigt. Außer diesen Sera standen uns noch zur Verfügung käuflich erworbene Shiga-Kruse- und polyvalentes Dysenterieserum, sowie mit Flexner-, Y- und E-Stämmen selbst hergestellte Sera. Nach dem Ausfall der im großen und ganzen gleichsinnig verlaufenen serologischen Untersuchungen waren die aus den Affen isolierten Stämme in die Flexner-Y-Gruppe einzureihen. Nach dem eindeutigen Ausfall der biochemischen Untersuchungen konnten diese Pseudodysenteriebazillen als Y (Hiss-Russel)-Bazillen angesprochen werden. Es war unmöglich, von den kranken Tieren Blut zu entnehmen, weshalb auf eine serologische Untersuchung des Patientenserums verzichtet werden mußte. Ebenso fehlen Kot- und Blutuntersuchungen von dem zur Zeit des Herrschens der Affenseuche erkrankten Wärter.

Zusammenfassend ergibt sich folgendes: Im Affenhaus eines Tiergartens erkranken einige Tage nach der Einfuhr 2 Menschenaffen an schweren Durchfällen, welche auf eine Infektion mit Y-Bazillen zurückzuführen sind. Angeblich durch Verwechslung der den Affen als Lager dienenden Matratzen wird die Krankheit auf weitere Insassen des Hauses übertragen. Insgesamt erkrankten 8 Menschenaffen (4 Todesfälle). Eine Verbreitung der

Seuche auf die anderen im Hause befindlichen Affen wurde vielleicht dank der getroffenen strengen Absperrungs- und Desinfektionsmaßnahmen verhindert.

In der Literatur finden sich einige Angaben vor, daß echte Bazillenruhr bei Affen vorkommen kann. Meist waren es Laboratoriumsinfektionen bei Rhesusaffen mit Flexner- oder Y-Bazillen (Ravaut und Dopter, Bowman, Bernhardt und Markoff, Jonesco und Combiesco). Während in diesen Fällen Ruhrübertragungen von den Tieren auf Menschen anscheinend nicht beobachtet wurden, schrieben vor einigen Jahren Bach, Fülscher und Harnack über das Auftreten von 17 Ruhrerkrankungen (Y-Bazillen) bei Menschen mit drei Todesfällen in Stelle (Bez. Lüneburg), welche durch kranke Affen aus Westafrika verursacht worden waren. Mit diesen Fällen dürften aber die Ruhrbazillenfunde bei Affen nicht erschöpft sein. Durch Umfrage in verschiedenen Instituten konnten wir nämlich erfahren, daß gelegentlich auch dort Dysenteriebazillen bei kranken Affen gefunden wurden. Ob die Seltenheit dieser Befunde nicht ihren Grund in der Seltenheit solcher Untersuchungen hat, müßte nun geklärt werden. Es ist bekannt, daß in Tiergärten und Tierschauen im Frühling und Herbst unter den Affen nicht so selten schwere, seuchenartig verlaufende Darmerkrankungen auftreten. Wenn man beobachtet, welche Anziehungskraft die Affenhäuser in Tiergärten auf das Publikum ausüben, wie Besucher, Erwachsene und Kinder, gesunde und krank erscheinende Affen berühren, streicheln und füttern, muß man sich eigentlich wundern, daß den Krankheiten der Affen im allgemeinen und den Darmkrankheiten insbesondere noch nicht mehr Aufmerksamkeit geschenkt wurde. (Vor einigen Jahren machte ein Regierungserlaß auf das Auftreten von Poliomyelitis bei Schimpansen im Kölner Zoologischen Garten aufmerksam.)

Nach der allgemeinen Erfahrung ist die Bazillenruhr eine spezifische Krankheit des Menschen. Die Ruhrbefunde bei Affen und die seinerzeit von Dold, sowie Dold und Fischer festgestellten Ruhrinfektionen bei Hunden in China sollten aber doch Anlaß geben, einmal systematische Untersuchungen über die Aetiologie der nicht so seltenen schweren Darmerkrankungen bei Affen und Hunden mit besonderer Berücksichtigung der Bazillenruhr anzustellen.

Schrifttum.

Lentz u. Prigge, Kolle, Kraus, Uhlenhuth, Handb. path. Mikroorg. 3. Aufl. — Bach, Fülscher u. Harnack, Veröffentl. Med.verwaltung **34**, H. 2. Berlin. Schoetz, 1931. — Dold, Dtsch. med. Wschr. **1916**, 811. — Dold u. Fischer, Zbl. Bakter I Orig. **85**, 198 (1921).

Aussprache.

W. Kruse (Leipzig): Zur Aussprache über die Ruhr am 27. März 1939 in Wien.

Man wird es zwar ohne weiteres verstehen, daß ich mich zu dieser Aussprache gemeldet habe, aber es liegt noch ein personlicher Grund für mich vor, denn wahrscheinlich wird es das letzte Mal sein, daß ich zu der Ruhr das Wort nehme; Sie werden also heute gewissermaßen den Schwanengesang eines alten Ruhrforschers hören. In erster Linie gestatten Sie mir einiges zur Geschichte der Ruhrforschung zu sagen, weil dadurch erst über die Benennung und Gruppierung der Ruhrbazillen vollständige Klarheit verbreitet wird. Wie wenigstens die Aelteren von Ihnen wissen werden, bin ich nicht zufällig vor 40 Jahren auf die Erforschung der Ruhrbazillen gekommen, sondern in Verfolgung systematischer Bestrebungen, die mich schon vor fast 50 Jahren bewegten. Damals war ich Bakteriologe an der Zoologischen Station zu Neapel und ergab mich naturgemäß dem Studium der damals in Deutschland noch wenig bekannten Blutparasiten, Kokzidien und Darmprotozoen. Eine letzte Frucht dieses Aufenthaltes war die Expedition nach Aegypten, die ich mit Pasquale zur Erforschung der Amöben-

dysenterie unternahm. Nebenbei bemerkt, führten wir dort den ersten und einzig sicheren Beweis für die Rolle der Amöben als Krankheitserreger, indem wir Ruhr bei Katzen durch die natürliche Reinkultur der Amöben in Leberabszeßinhalt erzeugten. Diese Beschäftigung mit der Ruhr der heißen Länder wurde aber auch entscheidend für meinen Entschluß, mich nach der Rückkehr aus Italien mit unserer einheimischen Ruhr zu befassen. Sie war ja anatomisch verschieden von der Amöbenruhr, mußte also eine andere Ursache haben. Leider war der Aufenthalt an den hygienischen Instituten in Breslau und Bonn zunächst für Ruhrstudien wenig ersprießlich, weil dort keine Ruhr bekannt war. Ich suchte mir zwar dadurch zu helfen, daß ich mir aus Gegenden, wo die Ruhr vorkam, Entleerungen schicken ließ; der Erfolg war aber gleich Null, weil, wie wir jetzt wissen, Ruhrbazillen längeren Aufenthalt in Stühlen nicht auszuhalten pflegen. Trotzdem waren diese Jahre von 1890—1900 für mich insofern nicht gleichgültig, als ich mir eine umfassende Kenntnis der Bakterien des gesunden und kranken Darms verschaffen und eine eigene Methode zu ihrem Nachweis und ihrer Unterscheidung ausarbeiten konnte: es war dies die Oberflächenkultur auf Platten, und zwar auf Gelatineplatten mittels Platinpinsels mit nachfolgender Prüfung der Kolonien im Zuckeragarstich. Diese verbesserte Technik machte es mir dann, wie ich auf der Naturforscherversammlung in Aachen 1900 sagte, geradezu zum Kinderspiel, die Erreger der Ruhr zu finden, als ich endlich die von mir so lange ersehnte Möglichkeit bekam, im Krankenhause zu Laar bei Ruhrort eine frische Ruhrepidemie zu studieren. Schon nach den ersten Tagen war es mir klar, daß der Erreger dieser klassischen diphtherischen Ruhr unseres Klimas nur ein plumpes, unbewegliches Stäbchen sein konnte, das oft von Eiterkörperchen aufgenommen wurde, mit dem Typhusbazillus die bekannte zarte weinblattähnliche Kolonieform und die mangelnde Gasbildung in Zuckeragar gemein hatte und auch in Krankenserum ähnlich wie der Typhusbazillus bei einer Verdünnung von wenigstens 1:50 spezifisch verklebt wurde. Derartige und einige weitere Eigenschaften waren damals von keiner einzigen der im Schrifttum schon nicht gerade seltenen Beschreibungen von sog. Ruhrerregern bekannt. Ich nannte daher den von mir gefundenen Keim den Bacillus dysentericus. In der Folge wurde diese meine Beschreibung und die Bedeutung dieses Bazillus allgemein anerkannt und eigentlich recht wenig Neues dazu getan. Schon einige Monate darauf fand ich selber aber bei einer im Bonner Irrenhause einheimischen Form der Ruhr, die ich schon vorher aus epidemiologischen Gründen von der echten epidemischen Ruhr abgetrennt hatte, sehr ähnliche, aber durch die Agglutination sofort zu unterscheidende Bazillen, die ich Pseudodysenteriebazillen nannte. Sie zerfielen, wie sich mir schnell ergab, im Gegensatz zu dem einheitlichen echten Bazillus in eine ganze Anzahl durch Agglutination verschiedener Rassen. Da Sera dieser Rassen sich zum großen Teil gegenseitig beeinflußten, war ihre Trennung nicht immer leicht, wurde aber sofort möglich durch Benutzung der Absättigungsmethode, die Castellani zu jener Zeit unter meinen Augen für die Fälle von Mitagglutination in der Typhusgruppe ausgearbeitet hatte. So gelang es uns bis zum Jahre 1907 die Pseudorassen A, B, C usw. bis G zu trennen. 1913 kam dazu die Rasse H, 1917 I aus unseren eigenen Beobachtungen und J aus denen von Schmitz. Diese Aufstellungen wurden dann durch zahlreiche weitere Untersuchungen meines Laboratoriums bestätigt. Sartorius und Reploh, die Schüler meines alten Mitarbeiters Jötten, ferner Hässler-Leipzig, also, wenn ich so sagen darf, auch Angehörige meiner Schule, bestätigten und vervollständigten schließlich in letzter Zeit diese schon lange Reihe von Pseudodysenteriebazillen durch Vergleiche mit den Funden ausländischer Beobachter. Man darf also sagen, daß die von mir angewandte serologische Methode oder, wie man jetzt zu sagen pflegt, Rezeptorenanalyse das Reich der Ruhrbazillen mindestens ebenso gründlich und sicher eingeteilt hat wie es neuerdings in der Typhus-Paratyphusgruppe geschehen ist. Nur liegen bei den Ruhrbazillen die Dinge etwas einfacher wie bei den letzteren, weil man nur den Bac. dysentericus und die Rassen des Bac. pseudodysentericus mit den Buchstaben A, B usw. zu unterscheiden hat, die sämtlich ruhrartige Erscheinungen erzeugen.

Die Pseudobazillen sind zwar durch ihre Agglutinationsverhältnisse viel enger miteinander verwandt als mit den echten Bazillen, aber auch bei ihnen habe ich schon lange gewisse Gruppen, nämlich Haupt- und Nebenrassen, unterschieden. Die Hauptrassen sind A, D, E und H, aber H steht wieder A näher als den übrigen. Einer weiteren Gruppenbildung bedarf es nicht.

Woran liegt es nun, daß trotz dieser seit mehr als 30 Jahren von mir und meinen Mitarbeitern geklärten und auch oft genug veröffentlichten Verhältnisse noch heute im Schrifttum so wenig Uebereinstimmung darüber und namentlich über die Nomenklatur der Ruhrbazillen besteht? Zunächst hätten doch auch die Mikrobiologen die Pflicht, sich möglichst nach der Regel, die für die beschreibende Naturwissenschaft sonst gilt, zu richten, nämlich die Benennung, die derjenige gibt, der die Bazillen zuerst so beschrieben hat, daß man sie wiedererkennen kann, anzunehmen. Meine Nomenklatur müßte also zur alleinigen Geltung kommen. Was tut man stattdessen? Noch heute gibt es Herren, die den Bac. dysentericus Shigabazillus nennen! Lucus a non lucendo: denn niemals ist wohl ein Bazillus so schlecht beschrieben worden als seinerzeit von Shiga, kein Bakteriologe konnte ihn danach wiedererkennen. Natürlich hat Shiga auch den Unterschied zwischen echten und Pseudobazillen bis zum Jahre 1902 gar nicht gekannt, sondern alle Ruhrbazillen zusammengeworfen. Immerhin

mag man, weil Shiga wenigstens das eine geleistet hat, daß er nämlich gramfreie, nicht verflüssigende Bazillen, die Traubenzucker nicht vergären, als Erreger von Ruhr nachwies, den echten Dysenteriebazillus, wenn man ihn durchaus nach Personen benennen will, mit dem Beinamen Shiga-Kruse versehen. Dann müßte man aber auch die Pseudodysenteriebazillen unter meinem Namen führen, weil ich sie überhaupt erst entdeckt und beschrieben habe. Stattdessen sprechen viele Leute hier von Flexnerbazillen. Die gibt es ebensowenig wie Shigabazillen aus demselben Grunde wie dort. Flexner hat bis 1902 auch die echten mit den Pseudobazillen zusammengeworfen und keine Rassen unter ihnen unterschieden. Also „Flexner a non flectendo". Nun sagen manche, ja wir müssen uns der angelsächsischen Nomenklatur anpassen. Ich sage, das wäre ja noch schöner, wo es sich um ganz deutsche Forschungsergebnisse handelt. Am Ende sollten wir auch noch die amerikanische Gattungsbezeichnung „Shigella" annehmen. Entschieden bin ich dagegen, wie überhaupt gegen diese große Zahl neuer mehr oder weniger geschmackvoller Namen, mit denen die amerikanischen Bakteriologen die Bazillen in Ordnung bringen wollen, die aber nur eine unnötige Belastung der schon so genug geplagten Mediziner bedeuten. Begnügen wir uns mit der durch natürliche Verwandtschaft ausgezeichneten Gruppierung, wie ich sie z. B. in meinen Büchern durchgeführt habe. Dann ist die gewünschte Ordnung da.

Ganz unberechtigt ist auch die Bezeichnung der Pseudodysenterie E als Sonne- oder Kruse-Sonne-Ruhr, da wir schon vor Sonne die Beziehung dieser Form zur sporadischen epidemischen Ruhr nachgewiesen haben (Hutt, Hilgers). Schließlich gehören auch die Rassen I und J, schon deswegen zur Pseudodysenterie, weil sie leichte Ruhr verursachen; allerdings weichen sie durch die höchst schwankende Ausbildung ihrer Antigene von den übrigen Pseudobazillen ab.

Ganz merkwürdig ist immer für mich die Aufnahme gewesen, die meine Benennung des Bac. pseudodysentericus gefunden hat. Manche wollen den Namen überhaupt nicht in den Mund nehmen, sondern sprechen von „giftfreien" Ruhrbazillen, Para- oder Metadysenterie- oder Colitisbazillen. Warum denn nicht Pseudodysenterie? Das ist der passendste Name, der überhaupt gefunden werden kann: Bazillen, die sehr leicht mit den echten Dysenteriebazillen verwechselt werden können und Erreger, die zwar auch Ruhr erzeugen können, aber durchschnittlich nicht die echte schwere Ruhr erzeugen, sondern eine leichte, oft ganz atypische mit einer Sterblichkeit von etwa 1 Proz. gegen 10 Proz. bei der echten, wie auch die neuesten dänischen und schwedischen Statistiken zeigen. Nun sagt man, es gebe ja auch manche schwere und tötliche Pseudodysenterien. Selbstverständlich, wie es auch leichte und schwere Masernfälle gibt, und trotzdem die Masern selbst von den Eltern als leichte Erkrankung angesehen werden. In Irrenhäusern, d. h. bei Paralytikern, verläuft ebenso selbstverständlich auch die Pseudodysenterie oft tötlich. Besonders die Kinderärzte, die im Krankenhaus Bakteriologie treiben, sperren sich gegen den Namen Pseudodysenterie, weil sie hohe Sterblichkeiten beobachten. Ganz natürlich, weil die sehr viel zahlreicheren leichten Fälle nicht ins Krankenhaus kommen. Genau so war es im Kriege in den Lazaretten. Die allermeisten Fälle von Pseudodysenterie verblieben an der Front (Hilgers). Natürlich paßt der wissenschaftliche Name Pseudodysenterie oder gar die Rassenbezeichnung nicht in die Krankheitsdiagnose für Laien: da darf es immer nur je nach dem Fall schwere oder leichte Ruhr heißen. Darf man aber etwa den Fall von Pseudodysenterie, der unter schwersten Vergiftungserscheinungen zum Tode verläuft, Laien und Bakteriologen als solchen hinstellen, der von „schwachgiftigen Ruhrbazillen" erzeugt sei?

Schließlich ist der Name „Pseudodysenterie" für eine ruhrartige Krankheit nicht anders gebildet als die der Pseudotuberkulose für eine Knötchenkrankheit der Nagetiere oder der Paratyphus, der „verkehrte Typhus". Die Analogie mit den Pseudodiphtheriebazillen habe ich von Anfang an abgelehnt, also ist ein Mißverständnis höchstens bei den Laien möglich, für die unsere wissenschaftliche Nomenklatur überhaupt nicht bestimmt ist.

Früher wurde weitere Verwirrung in die schöne Ordnung der Ruhrbazillen getragen, als man sie noch nach dem Verhalten gegenüber Zuckerarten und Zuckeralkoholen oder nach der Indolprobe unterscheiden wollte. Damals sprach man von Flexner-, Y-, Harris-, Strong- und anderen Typen der Ruhr. Das habe ich nie mitgemacht, und davon ist man auch meist zurückgekommen, seitdem wir die Unbeständigkeit derartiger Merkmale nachgewiesen haben. Es scheint mir kein Vorteil, daß einige Forscher jetzt wieder zum Teil in den alten Fehler zurückfallen wollen. Es geht wirklich nicht an, ohne die regelrechte Serumdiagnose Ruhrbazillen sicher zu erkennen. In einer sonst sorgfältigen Arbeit glaubt Boylén auf Grund epidemiologischer Zusammenhänge die Zuckerproben wieder empfehlen zu sollen. Wenn sich das wirklich bestätigen sollte, so könnte man höchstens die einzelnen serologischen Rassen ja nach dem Ausfall der Zuckerproben wieder in Unterrassen einteilen.

Offen gestanden hat es mich schon lange gewundert, warum man immer wieder den Versuch macht, die Ruhrbazillen statt durch die Serumdiagnose durch biochemische Reaktionen zu kennzeichnen. Ich leugne ganz entschieden, daß sie selbst in der Hand eines und desselben Forschers gut verwertbare Ergebnisse liefern. Auch die Mannitprobe ist nicht mehr entscheidend für die Trennung der echten von der Pseudoruhr. Das gilt ebenfalls von der Milchzucker- und Indolreaktion. Alle solche Proben geben höchstens einen oberflächlichen Anhalt,

aber keine Sicherheit, und verlangen so viel Zeit, daß man inzwischen längst mit der Serumprobe, einschließlich der Absättigung, fertig werden kann. Ich mache sie grundsätzlich im hängenden Tropfen, weil man dafür nur kleinste Mengen Blut braucht, was bei kleinen Kindern sehr erwünscht ist, und weil man die Entwicklung der Reaktion mit dem bewaffneten Auge besser verfolgen kann.

Die Frage der Ruhrgifte wurde heute besonders eingehend behandelt, und ich erkenne gern an, daß Fortschritte in der Kenntnis ihrer chemischen Zusammensetzung gemacht worden sind. Wesentlich erscheint mir aber, daß nun endlich die von mir und Selter gemachten Untersuchungen über die doppelte Natur der Ruhrgifte bestätigt worden sind. Freilich ist das hitzempfindliche Toxin der echten Ruhrbazillen im Gegensatz z. B. zum Diphtherie- und Tetanusgift kein Sekret, sondern eigentlich auch ein Endotoxin, weil es schon fertig in den jungen Leibern der Bazillen gebildet ist. Auch sonst kommt man mit der üblichen Nomenklatur nicht aus, weil das Endotoxin der Ruhrbazillen nicht mehr ein „Bakterienprotein“, sondern ein Kohlenhydratlipoid sein soll. Schließlich sehe ich den Beweis dafür nicht erbracht, daß das Ruhrtoxin überhaupt für den Menschen von Bedeutung ist. Wir haben das von jeher bezweifelt, weil die charakteristischen Lähmungserscheinungen, die beim Kaninchen und bei der Maus so deutlich sind, beim Menschen ebenso wie beim Meerschweinchen fehlen.

Daraus folgt, daß die Auffassung, das Ruhrserum entwickle beim dysenteriekranken Menschen wesentlich antitoxische Eigenschaften, nach wie vor sehr zweifelhaft ist. Wir haben immer nur bakteriolytische und allerdings schwache antiendotoxische Eigenschaften angenommen. Die letzteren weiter zu entwickeln, wird allerdings schwer sein. Ob die Reindarstellung des Endotoxins daran etwas ändern wird, müssen wir abwarten. Jedenfalls würde ich vorschlagen, für die aktive Immunisierung mindestens bei der Pseudodysenterie, wo sie bisher recht gute Ergebnisse gehabt hat, nach wie vor die ganzen abgetöteten Bazillen zu verwenden, und zwar nicht polyvalente Impfstoffe, sondern aus den einzelnen Rassen hergestellte. Wenn die enterale Impfung sich wirklich als erfolgreich erweisen sollte, was mir vorläufig noch nicht erwiesen erscheint, so wäre das ja sicher ein Fortschritt. Die Wirksamkeit von Bakteriophagen möchte ich, falls sie sich bewährt, mehr auf ihren Gehalt an Antigenen als auf den an Phagen beziehen. Ob man bei der Bazillenruhr auf unspezifischem Wege Erfolge erzielen kann, darüber wird ja schon lange gestritten. Jedenfalls würde ich dafür auch unsere Cumasina-Silberpräparate empfehlen, weil sie im Darm eine kaum sonst erreichte desinfizierende Wirkung besitzen.

Ueber die Variabilität der Ruhrbazillen habe ich mich schon wiederholt und zuletzt noch ausgesprochen bei Gelegenheit der gelben Typhusbazillen. Selbstverständlich sind die Ruhrbazillen wie alle anderen Bakterien in gewissen Grenzen veränderlich, aber gerade die Agglutinine sind es am allerwenigsten, so daß wir schon dadurch genügenden Grund haben, die serologische Einteilung allen anderen vorzuziehen. Daran ändert nichts die Tatsache, daß uns gelegentlich besonders bei den Pseudodysenterierassen I und J der Verlust der Agglutinabilität und der Agglutinogene Schwierigkeiten für die Diagnose bereiten, und daß genau daß von einer mathematisch genauen Scheidung nicht gut gesprochen werden kann. Das ist genommen die einzelnen Stämme jeder Art und Rasse individuelle Eigenschaften besitzen, so bei allen Bakterien, ja bei allen Lebewesen nicht anders. Trotzdem bleiben die Typen wohl erkenntlich und dementsprechend die epidemiologischen Zusammenhänge. Wenn nun einzelne Forscher eine viel weitergehendere Veränderlichkeit der verschiedenen Rassen, ja Uebergänge in Typhus-Paratyphus-, Coli- und Alcaligenes-Bazillen gesehen zu haben behaupten, so bin ich am wenigsten geneigt, derartige Möglichkeiten glatt abzuleugnen, habe ich sie bis zu einem gewissen Grade doch selbst erwogen, aber ich habe auch immer wieder gewarnt, aus solchen Beobachtungen sichere Schlüsse zu ziehen, weil es genug Fehlerquellen dafür gibt, und vor allen Dingen habe ich mich gehütet, umstürzende epidemiologische Folgerungen aus solchen immer vereinzelten Vorkommnissen abzuleiten. Dazu berechtigen uns auch nicht die Verschiebungen, die im Laufe der Zeit in der Verbreitung der echten Dysenterie und der einzelnen Pseudodysenterierassen unzweifelhaft wenigstens im Norden Europas eingetreten sind. Sie lassen sich sehr wohl anders erklären als durch Umwandlung der Ruhrtypen ineinander.

Aus dieser meiner im wesentlichen geschichtlichen Darstellung erhellt, daß wir schon seit langer Zeit durch unsere deutschen Forschungen über die Ruhr und ihre Abarten so gut unterrichtet sind wie über irgendeine andere Infektionskrankheit. Selbstverständlich sind weitere Forschungen über Einzelheiten sehr dankenswert.

Zur Geschichte und Epidemiologie der Bazillenruhr vgl. Kruse, Dtsch. med. Wschr. 1900, Nr. 40; 1901, Nr. 23,24; 1903, Nr. 12; 1907, Nr. 8/9; Münch. med. Wschr. 1917, Nr. 40; Einführung in die Bakteriologie 2. Aufl. 1921; ferner [illegible], Z. Immunitätsforschg. Bd. 20 [illegible]
Z. Immun.forschg, Bd. 5 (1910). Ueber Variabilität Kruse, Münch. med. Wschr. 1939, 117. Neuere Letalitätsstatistiken bringen u. a. Böylén, Dysenterie in Dänemark. Kopenhagen 1934, und Engleson, Dysenteriestudien. Lund 1937.

Prof. A. Azzi (Kgl. Hygienisches und Mikrobiologisches Institut der Universität von Turin, Italien): **Experimentaluntersuchungen über die antidysenterische Vakzination „per os".**

Den Bericht und die Vorträge über Dysenterie habe ich mit lebhaftem Interesse verfolgt und gestatte mir diesbezüglich die Ergebnisse einiger in meinem Institute ausgeführten Untersuchungen über die antidysenterische Vakzination „per os" darzulegen.

Mein Schüler Privatdozent Pugnani wählte als Versuchstier das Kaninchen, als Vakzine ein Gemisch von 2 Milliarden dysenterischer, paradysenterischer und metadysenterischer Keime, welche mit einer Sodalösung und Glyzerinzusatz lysiert wurden.

Die Vakzine wurde bei leerem Magen in Zeitabständen von je 48 Stunden dargereicht, und zwar ohne vorherige Gallendarreichung, da die trotz einer partiellen Neutralisation und des Glyzerinzusatzes stark alkalische Flüssigkeit als lösend für den Gedärmschleim anzusehen war. Für die Einführung der Vakzine in den Oesophagus des Kaninchens führte er, gerade so wie eine Sonde, einen kleinen Gummikatheter in den Pharynx ein, welcher auf eine mit Vakzine gefüllte Rekordspritze von 2 ccm Inhalt aufgesteckt worden war.

Alle für die Untersuchung bestimmten Kaninchen wurden vorher gewogen und zur Ader gelassen, um den Agglutinationsversuch mit dem Serum sowohl für die Shigella dysenteriae allein als auch für die ganze Familie der für die Bereitung der Vakzine benutzten Keime auszuführen. Diese Versuche wurden 10 Tage nach der letzten Darreichung wiederholt.

Die Vakzine wurden 4mal, in Zeitabständen von je 48 Std., mit einer Gesamtmenge von 8 Milliarden teilweise oder gänzlich lysierter Keime dargereicht.

Gleichzeitig wurden Kontrolltiere einer viermaligen intramuskulären Inokulation mit einer 2 Miliarden dysenterischer Keime pro ccm enthaltenden, mit Formol versetzten Vakzine unterworfen.

Die Ergebnisse der verschiedenen Versuche gestatteten uns festzustellen, daß eine lysierte, „per os" dargereichte antidysenterische Polyvakzine immunitäre Vorgänge in den Tieren hervorrufen kann, welche man sowohl durch die Agglutination, die Bakterizidie und die Phagozytose betreffenden Versuche als auch — was durchaus das Wichtigste ist — durch einen höheren Widerstand gegen intravenöse Experimentalinfizierung mit massiven Keimmengen feststellen kann.

Abgesehen von der experimentellen Dysenterie scheinen weitere Untersuchungen und Beobachtungen, die in meinem Institut ausgeführt worden waren, den Nachweis gebracht zu haben, daß gewisse Darmstörungen eine doppelte Ursache haben können. Sie können von abnormen Fäulnisprozessen abhängen, die durch das Ueberwiegen der der Escherichia coli antagonistischen Darmflora bewirkt sind, oder von einer Zunahme des pathogenen Vermögens der Escherichia coli selbst, die von den abnormen Darmprozessen ausgelöst wird.

Auf Grund folgender Beobachtungen haben wir die Wirksamkeit eines oral verabreichten Bact. coli-Vakzins geprüft. Es handelte sich um ein polyvalentes Vakzin, das durch wiederholtes Einwirken von Gefriertemperatur und Wärme auf verschiedene Stämme von Escherichia coli erzeugt wurde. Das Menstruum war eine Mischung vom Glyzerin und 10 Proz. Natriumkarbonat in gleichen Volumsverhältnissen. Diese Mischung fördert die Lysis und die Adsorption der mikrobischen Lysate seitens der Darmschleimhaut.

In präliminären Untersuchungen an Kaninchen hatten wir festgestellt, daß dieses Vakzin oral verabreicht den Tieren eine gewisse Immunität verleiht, die man am Vorkommen von spezifischen Antikörpern im Blute erkennen konnte. In anderen Untersuchungen wurde das Vakzin bei den Sommerdiarrhoen der Kinder angewendet.

Diese Darmstörungen haben bei uns in Italien verschiedenen Ursprung. Es handelt sich manchmal um abnorme Gärungen, die durch das Ueberwiegen der alkalisierenden Flora oder der säuernden Darmflora bedingt sind. Diese Prozesse bedingen ein Milieu, in welchen eine Zunahme des pathologischen Vermögens der Escherichia coli beobachtet wird, was ein paradoxes Phänomen ist, insofern als die Virulenzsteigerung der Escherichia coli durch die Antagonisten bewirkt wird.

Die klinischen Untersuchungen haben gezeigt, daß das angewendete Vakzin die normale Darmflora wiederherstellt, sei es daß die Gesamtflora abnimmt, sei es daß die Abnahme nur die säuernde oder die alkalisierende Flora betrifft.

Die Wirkung des Vakzins wird von mir so gedeutet: Die Darmstörungen hängen ab vom Ueberwiegen der Antagonisten der Escherichia coli in der Darmflora, die nicht nur ein gewisses pathogenes Vermögen ausüben, sondern auch die Produkte des Stoffwechsels der Escherichia coli neutralisieren und so die auf den Organismus so nützliche Einwirkung des normalen Darmsaprophyten ausschalten. Manchmal bewirken die Antagonisten sogar eine Veränderung des biologischen Charakters der Escherichia coli, die nunmehr nicht nur nutzlos, sondern sogar schädlich wird. Mittels der Colilysate erhält der Darm in Fällen von pathologischen Störungen direkt die Aufbaustoffe und die Stoffwechselprodukte der normalen Escherichia coli, und ist daher in der Lage, die Coliantagonisten zu bekämpfen. Gleichzeitig kann auch der Organismus gegen die Krankheitsursache reagieren, die Darmflora wieder normal gestalten und so die Ursachen der abnormen Darmstörungen ausschalten.

Es ist dann die Annahme berechtigt, daß die Colilysate auch eine spezifische Vakzinwirkung ausüben können insofern, als sie jene Colistämme verändern oder zur Ausscheidung bringen, die infolge der Abnahme der immunitären Abwehrstoffe des Organismus ihre normale Physiognomie verloren und pathogenes Vermögen angenommen haben.

Auf Grund dieser und anderer in meinem Institut ausgeführten Untersuchungen können wir die Annahme der spezifischen Wirkung der per os verabreichten Vakzine verallgemeinern.

Dr. Schad (Oberfeldarzt und Hygieniker beim Wehrkreisarzt V, Stuttgart): **Ueber Ursache und Verlauf einer Ruhrepidemie (Flexner) bei zwei Truppenteilen.**

Ein Regiment X marschierte in 5tägigem Marsch an heißen Sommertagen von seinem Standort über ein Mittelgebirge zu einem Truppenübungsplatz. Während des Marsches wurden teils Biwaks teils Ortsunterkünfte bezogen. Am 4. Marschtage erkrankten zwei, am 5. drei Mann der 10. Kompagnie an fieberhaften Durchfällen. Diese Leute wurden teils in Krankenhäusern, die auf der Marschroute lagen, und teils nach Eintreffen auf dem Truppenübungsplatz im dortigen Krankenrevier untergebracht. Nachdem das Regiment das auf dem Truppenübungsplatz gelegene Lager bezogen hatte, erhöhten sich die Erkrankungsfälle auf 52, wobei auffiel, daß die 10. Kompagnie zuerst und bei weitem prozentual am höchsten beteiligt war. Inzwischen war aus den Stuhlproben, die von den ersten Erkrankten eingeschickt waren, Flexner-Ruhr gezüchtet worden. Schon als sich die Krankenzahl auffällig erhöhte, waren Absperrmaßnahmen angeordnet worden, die nach Sicherstellung der Diagnose dahin verschärft wurden, daß die Unterkunft des Regiments X völlig gegen das übrige Lager abgesperrt wurde. Es konnte jedoch nicht vermieden werden, daß die Epidemie auf ein im Lager benachbart untergebrachtes Regiment bereits übergegriffen hatte. Es war ersichtlich, daß genau entsprechend der Inkubationszeit der Ruhr an dem Tage des Eintreffens des Regimentes X auch bei dem Regiment Y schon Kontaktinfektionen gesetzt wurden. Wiederum ein Beweis für die außerordentlich starke Kontagiosität der Ruhr. Bei dieser Ruhrepidemie entstanden bei dem Regiment Y, obwohl nur 1½ Tage Berührungsmöglichkeiten, z. B. gemeinsame Aborte und Waschplätze, mit dem Regiment X bestanden, 61 Erkrankungsfälle. Entsprechend wurde selbstverständlich auch das Regiment Y abgesondert. Es war nicht mehr zu verhindern, daß ein weiteres Regiment Z das Lager bezog, da es bereits im Einrücken war. Dieses wurde nun abermals gegen das Regiment X und Y völlig abgesondert untergebracht. Es konnte dadurch vermieden werden, daß auch nur ein einziger Krankheitsfall in diesem neuen Regiment auftrat.

Welches war nun die Ursache dieser Ruhrepidemie, wo doch angeblich weit und breit keinerlei Ruhrfälle vorgekommen waren? Der endgültige Verdacht wurde auf ein Tagesbiwak gelenkt, das während des Marsches in einem wildromantischen Tal in der Nähe eines Baches bezogen war. Der Truppenarzt, über diesen Bach befragt, teilte mit, daß es sich um einen klaren, reißenden, kalten Gebirgsbach gehandelt habe. Es war den Leuten trotzdem verboten worden, Wasser zu trinken. Der zuständige Kreisarzt aus dieser Gegend konnte auf Befragen mitteilen, daß keinerlei Typhus-, Paratyphus-Ruhrerkrankungen oder auch nur Verdachtsfälle aus dieser Gegend gemeldet waren. Wie sah nun die Sache an Ort und Stelle aus? Als der Weg mich nach drei Wochen in die Gegend führte, besah ich mir den Biwakplatz. Etwa 15 Meter über dem Bach befindet sich ein im Sommer von zahlreichen Kurgästen besuchtes Gasthaus. Am Haus ein großer Dunghaufen und ein Abort, dessen Abwässer durch eine Rinne nach dem Gebirgsbach geleitet werden. In der heißen Jahreszeit ergießt sich diese Rinne direkt in den Bach, während bei Regenwetter die Abwässer in einem Rohr gesammelt und über den Bach auf eine Wiese weitergeleitet werden. Ein Ortsansässiger gab mir an, daß in den letzten Wochen bei sehr vielen Leuten der Gegend, auch bei Kurgästen, mehr oder weniger heftige Durchfälle (auch blutige) aufgetreten seien. Man dürfe darüber jedoch nicht sprechen, da sonst der Fremdenverkehr notleide. Somit dürfte mit größter Wahrscheinlichkeit die Ursache der Epidemie geklärt sein. Die 10. Kompanie lagerte direkt am Bach unterhalb der Ausflußstelle der oben näher erläuterten Rinne und spülten ihre Eßgeschirre in dem Wasser, dem an dieser Stelle zusätzlich der Grubeninhalt — es herrschte heißes Wetter — beigemengt war. Manche Erkrankte gaben auch zu, trotz Verbots aus dem Bach Wasser getrunken und die Zähne geputzt zu haben. Einflüsse des Klimas auf die Epidemie sind also nur so weit zu erkennen, als die Einleitung des Abwassers in den Bach ausschließlich an heißen Tagen geschah.

Jac. Jansen (Utrecht, Niederl.): **Ueber Ruhrerkrankungen bei Menschenaffen.**

Im Institut für parasitäre- und Infektionskrankheiten der Tierärztlichen Fakultät der Universität in Utrecht (Niederl.) empfing ich aus einem Tierpark Rhesusaffen. Sie waren an Enteritis, hauptsächlich des Dickdarmes, gestorben. Die parenchymentösen Organe waren nahezu immer steril. Aus den Darmgeschwüren gelang es aber mittels Endo- und Laktose-Lackmus-Agarplatten Flexnerkeime zu züchten. Es zeigte sich, daß aus dem Blut der

toten Affen Serum zu gewinnen war, welches eine positive Agglutination mit Flexnerbazillen gab. Die histologische Untersuchung zeigte, daß die Veränderungen des Darmes bis zur Muscularis mucosae gingen. Die Krankheit hatte einige Wochen nach der Ueberbringung in die Winterraume angefangen. Prof. Snyders (Amsterdam) teilte mir mit, er habe bei seinen Laboratoriumaffen einige Male Flexner-W-Infektionen gehabt. Es zeigte sich dabei, daß der Mensch sich leicht von Flexner-W-kranken Affen infizieren kann.

H. Schmidt (Marburg, L., Behring-Institut):

Es scheint klinisch noch nicht sicher zu sein, ob bei der Shiga-Kruse-Ruhr das Endotoxin für die klinischen Erscheinungen besonders pathogenetisch in Betracht kommt, aber bei den sog. nichttoxischen E-Y-Flexner- u. a. Ruhrfallen beruhen die klinischen Ruhrsymptome auf dem Endotoxin, das in reiner Form isoliert nach Untersuchungen von R. Haas gelegentlich toxischer sein kann als das Endotoxin der Shiga-Krusebazillen. Weil Antiendotoxine identisch mit den o-Agglutininen sind, ist es erforderlich, daß letztere in der erforderlichen Polyvalenz in den Ruhrseren vorhanden sind.

Aus diesem Grund muß auch die aktive Schutzimpfung gegen Ruhr das Endotoxin in Betracht ziehen. Dieses ist aber in der üblichen Weise der Formoltoxoidherstellung nicht zu entgiften, was aber zur Erzielung einer moglichst verträglichen Injektion sehr anzustreben ist. Formol bewirkt keine Toxoidbildung. Die nach längerer Zeit der Einwirkung von Formol bei höherer Temperatur bewirkte Abschwächung, die mit Bildung unlöslicher Bodenkörper einhergeht, ist eine Säurehydrolyse mit Zerstorung der antigenen Wirkung. Spaltet man den toxischen Polysaccharid-Lipoidkomplex z. B. durch Saurehydrolyse, so ist weder das Polysaccharid als solches noch die Lipoide, die nach Boivier Palmitin- und Stearinsäureverbindungen enthalten, toxisch. Nur die Verbindung ist toxisch im Sinne einer enterotropen Wirkung, obwohl auch mit reinen Endotoxinpraparaten bei Mausen gelegentlich auch neurotrope Wirkungen zu beobachten sind. Die Phagenwirkung bei der Ruhr ist vielleicht eine solche Spaltung, vielleicht aber auch eine Zerstörung der Fettsäurenkomplexe, denn das Vi-Antigen der Typhusbazillen ist eine Polysaccharid-Lipoidverbindung gleicher Art wie das o-Antigen, und es gibt nach Craigie Phagen, die elektiv das Vi-Antigen angreifen. Hier ist noch vieles unklar.

S- und R-Formen sind heute serologische Begriffe. Es gibt S-Stämme von Shiga-Krusebazillen, die keinerlei o-Antigen in nachweisbarer Form enthalten (R. Haas). Trotzdem dürfte die Immunisierung mit solchen Bazillen Antikorper bilden, die aber als Agglutinine wegen der sehr ausgeprägten Neigung zu Spontanagglutination nicht mit Sicherheit feststellbar sind. Welcher Art sind diese Antikorper? Anti-H? Gibt es ein H-Antigen bei Ruhrbazillen? In der Literatur sind öfters bewegliche Ruhrbazillen beschrieben worden, demnach potentiell eine H-Antigenausbildung moglich, die aber rudimentär bleiben kann. Ob damit das kleine o von Prigge zusammenhängt? Hier ist noch weitere Forschung nötig. Das Trypaflavin ist von italienischen Autoren als spezifisch für R-Formen-Agglutinationen eingeführt, doch ist das heutige Trypaflavin angeblich nicht mehr das gleiche und für diesen Zweck weniger tauglich.

Z. Teveli (Budapest):

Die mit blutigen oder eitrigen Stühlen einhergehenden Enteritiden werden als Ruhrerkrankungen betrachtet, da in 90 Proz. solcher Fälle Ruhrbazillen aus den Stühlen gezüchtet werden konnten. Die an der Budapester Kinderklinik übliche Einteilung der Ruhrfälle wird mitgeteilt. Ueber 9 teils publizierte Fälle von Ruhrerkrankungen des Urogenitaltraktes wird berichtet.

C. Clauberg (Berlin):

In Deutschland erscheint die Kruse-Shiga-Ruhr für die bakteriologische Praxis von untergeordneter Bedeutung. Mir selbst begegnete beispielsweise in Berlin seit 1922 unter riesigem Material nur ein einziger einschlägiger Fall, und dieser betraf noch einen aus dem Ausland zugereisten Hotelinsassen.

Ganz anders verhält es sich mit der E-Ruhr. Die E-Ruhr-Bazillenbefunde können zeitweise geradezu beunruhigende Zahlenwerte erreichen. Nach unseren Erfahrungen muß dabei sogar mit häufigem Bazillenträgertum gerechnet werden. Wir vermochten verschiedentlich bei Massen-Umgebungsuntersuchungen festzustellen, daß in einzelnen Bevölkerungsgruppen das E-Ruhr-Bazillenträgertum die Regel, die E-Ruhr-Erkrankung die Ausnahme sein kann. Die aus den Zahlenangaben der Vorredner abgeleitete stetige Zunahme der E-Ruhr in Deutschland dürfte — wenigstens teilweise — scheinbar und nicht zuletzt darauf zurückzuführen sein, daß sich die Medizinaluntersuchungsämter immer mehr auf die früher sicher nicht genügend gewürdigten diagnostischen Besonderheiten des E-Ruhr-Keimes einstellen.

Auch die sog. Flexner-Y-Ruhr (wir bezeichnen sie in meinem Institut zu Ehren des Nestors der Ruhrforschung und ihres ersten systematischen Bearbeiters als Krusesche Pseudoruhr-Gruppe) spielt bei uns eine sehr beachtliche Rolle. Die heute hier genannten Zahlen über ihre Verbreitung in Deutschland stellen allenfalls Mindestwerte dar. Die Vielfalt ihrer Erreger macht aus diagnostischen, epidemiologischen und — wie die heutigen Darlegungen zur spezifischen Behandlung erneut erkennen ließen — aus therapeutischen Gründen eine genaue Differenzierung erforderlich. Biochemische Kennzeichen versagen bekanntermaßen. Wir müssen wohl oder übel zu serologischen Unterscheidungen greifen. Der einzige Weg hierzu ist und bleibt die Rezeptorenanalyse. Das mit ihrer Hilfe von mir seinerzeit in systematischer Arbeit gewonnene Rezeptorenschema hat sich uns in jahrelanger Erfahrung als wertvolles und unentbehrliches Hilfsmittel zur sicheren Identifizierung der hierher gehörigen verschiedenen Erregerformen bewährt (vgl. Zbl. Bakter. I Orig., Bd. 124, S. 23, 1932, und Bd. 128, S. 269, 1933). Es gründet sich in Würdigung der deutschen wissenschaftlichen Tradition auf die Krusesche Terminologie und geht von den Typen A, B, D sowie H aus.

Verwunderlich erscheint, daß neuerlich die Serologie der R-Varianten innerhalb der Kruseschen Pseudo-Ruhrgruppe so stark betont wird. Man muß sich doch darüber klar sein, daß in der Praxis fast ausschließlich die S-Formen entscheidende Bedeutung haben und daß die R-Formen sozusagen nur die defekten Abarten darstellen. Daran ändert nichts die Tatsache, daß die Ruhrkeime außerhalb des menschlichen Körpers besonders leicht in die R-Form übergehen. Was uns meines Erachtens in erster Linie interessieren muß, ist die für den infektiösen Charakter der Ruhrkeime maßgebende serologische Beschaffenheit. Diese wiederum ist bei der gegebenen Sachlage nur an frisch aus dem menschlichen Körper gezüchteten Keimen hinreichend zu ergründen und hat ihre Basis offensichtlich in der Antigenstruktur der S-Formen. Es scheint also geboten, letztgenannte nicht zu vernachlässigen, d. h. der Rezeptorenanalyse der S-Formen die ihr gebührende Beachtung zuteil werden zu lassen. Dieser Weg bietet ohnehin die derzeit einzige Möglichkeit, den Medizinaluntersuchungsanstalten die von ihnen schon längst erwarteten, durch entsprechende Absättigung gewonnenen Spezialsera zur sicheren Erkennung der einzelnen Pseudo-Ruhrbazillen-Typen zur Verfügung zu stellen. Auch die Forschungen zur Immunotherapie der Ruhr werden sich notwendig auf die Rezeptorenanalyse der S-Formen stützen müssen. Die Serologie der R-Formen ist hierbei nach meinem Dafürhalten nur insofern beachtlich, als sie uns Abwegigkeiten im Antigenaufbau der für die Impfstoffgewinnung benutzten Keime erkennen und durch sie bedingte Störungen im Immunisierungsprozeß vermeiden läßt.

O. Müller (Duisburg):

Es wird kurz berichtet über die Verteilung der Ruhrformen am Niederrhein. Fast keine Rolle spielt die Shiga-Kruse-Ruhr, dagegen die Pseudodysenterie Flexner erheblich mehr und am meisten in den letzten Jahren die Kruse-Sonne-Bazillenruhr. Zusammen mit Sartorius' Typenfeststellung der Pseudoruhrfälle, dabei vorwiegend A und D-Formen, einzelne H-Formen, z. B. bei Polizeimannschaft Hamborn 10 A-Fälle durch Kartoffelsalatinfektion. Wichtig ist es, bei Kruse-Sonne-Ruhrfestellung Widal schon mit niederem Titer anzusetzen; so wurde in Lüdenscheid der 1. Fall festgestellt durch Widal 1: 25, dem später Feststellung der Bazillen im Stuhl folgte. Zunahme der Kruse-Sonne-Ruhr bei Erwachsenen, so Infektion bei Arztfamilie, wobei 3 Erwachsene und 2 Kinder erkrankten, sowie 2 Krankenschwestern in den letzten Monaten. Die Prognose ist ernster zu stellen als früher, da auch schwere Fälle vorkommen, wie ja auch Fromme-Witten festgestellt hat.

K. Kißkalt (München):

Was die Zunahme der Ruhr in manchen Jahren anlangt, so muß stets betont werden, daß wir nicht die vorgekommenen, sondern nur die gemeldeten Fälle kennen. Ihre Zahl ist von vielen Faktoren abhängig, z. B. davon, daß die Aerzte durch Abänderung der Meldevorschriften von neuem auf die Anzeigepflicht aufmerksam gemacht werden.

In der Epidemiologie ist die Abhängigkeit der Ruhrfälle vom heißen Sommer sehr auffallend. Sie zeigt sich auch bei Ruhrepidemien, z. B. der, die 1779—1783 wütete, diese kam vom Osten, ging zunächst an Königsberg vorbei, aber in dem heißen Jahre 1781 trat sie dort mit höchster Intensität auf (Z. Hyg. Bd. 93, S. 501). Auch im Weltkrieg war Deutschland nur in dem heißen Jahre 1917 stark befallen, nicht 1916 und 1918.

Nach Herrn Siegl haben nur 22 Proz. der Kranken Blut im Stuhl. Das erschwert die Definition des Begriffes „anzeigepflichtiger Ruhrverdacht", und ich möchte ihn fragen, wann nach seiner Ansicht auf Grund klinischer Symptome diese Meldung zu erstatten ist.

Hertel (Leipzig): **Zur spezifischen Therapie der bazillären Ruhr.**

Die an der Leipziger Klinik gesammelten Erfahrungen der letzten 4 Jahre über das therapeutische Vorgehen bei der bazillären Ruhr zeigen, daß die Serumtherapie eine nur unbedeutende Rolle gespielt hat. Die an der Klinik nicht wenig anfallenden Ruhrfälle ver-

teilen sich ziemlich gleichmäßig auf Flexner, Ypsilon und E-Typen. Bei keinem Erkrankungsfall wurde Dysenterieserum verabreicht, sondern eine komplexe Therapie getrieben, die sich aus den großen Gesichtspunkten der lokalen antibakteriellen Behandlung, lokalen Absorption moderner Diätetik und Kreislaufbehandlung zusammensetzt. Todesfälle wurden nicht beobachtet, obwohl Erkrankungen mit schweren Komplikationen, z. T. auch toxischer Art (zentral-nervös!) nicht selten waren. Die berechtigte Indikation der Dysenterieserumbehandlung auf die Shiga-Kruse-Ruhr ist praktisch ohne Bedeutung, da letztere in Deutschland nur noch selten vorkommt. Die Ablehnung der spezifischen Serumtherapie für die bei uns vorkommenden Ruhrfälle erhält durch die auch mit Serum nicht zu verbessernde Heilungsziffer, die wegfallende Sensibilisierung und die größere Wirtschaftlichkeit ihre Berechtigung.

Kathe (Breslau):

Zwei kurze Bemerkungen zur Verbreitung von Shiga-Kruseruhr in Schlesien und zur Ruhrstatistik:

In den fast 28 Jahren, die ich in meinen Arbeitsgebiet überblicke, hatten wir eine große Shiga-Kruse-Epidemie 1911, die der von Herrn Poetschke beschriebenen weitgehend gleicht (Beninde u. Kathe, Veröffentl. a. d. Geb. d. Med.verwaltung 1912); seitdem nur ganz vereinzelte Fälle. Für die Epidemie wie für die sporadischen Erkrankungen ließ sich nachweisen, daß sie aus dem Auslande eingeschleppt waren (hauptsächlich durch Wanderarbeiter). Der letzte Fall, den wir erst vor wenigen Wochen feststellen konnten, betraf eine Frau, die sich auf einer Italienreise infiziert hatte. Die Shiga-Kruse-Ruhr ist also für Schlesien eine „Fremdseuche".

Die amtliche Statistik der durch die giftarmen Typen bedingten Ruhrerkrankungen ist fast wertlos; sie gibt in gewissem Sinne Mindestzahlen, mehr nicht. Der Arzt meldet in der Regel nur den Fall als Ruhr, der bakteriologisch-serologisch nachgewiesen ist; während doch die Diagnose auf Grund der klinischen Erscheinungen, vor allem Blut, zum mindesten aber Schleim im Stuhl, gestellt werden sollte.

Ein Beispiel für die Einstellung der Aerzte zum Ruhrproblem und für den Wert der Ruhrstatistik: In einem Industrieort von 20000 Einwohnern hatte ich Typhus zu bekämpfen und zu diesem Zwecke dort ein Zweiglaboratorium eingerichtet. Ich erkundigte mich auch nach Ruhr, erhielt von den Aerzten aber die Auskunft, Ruhr gebe es nicht. Die Ortspolizeibehörde erklärte, seit 25 Jahren sei keine Ruhrmeldung eingegangen.

Dann fragte ich nach Magendarmkatarrhen — es war im Sommer —, und bekam von den ortsansässigen Aerzten die Antwort, daß sie zahlreiche derartige Fälle zu behandeln hätten. Ich erhielt auf meine Bitte die Genehmigung, solche Patienten aufsuchen und ihren Stuhl sofort am Krankenbett bakteriologisch verarbeiten zu dürfen: nach einigen Wochen hatte ich eine ansehnliche Flexner-Y-Epidemie beisammen.

Einen Begriff von der Verbreitung dieser Ruhr bekommt man durch systematische Prüfung aller eingesandten Blutproben auf Ruhragglutinine. Ich erhielt in Schlesien einen Hundertsatz von 25—30 positiver Befunde.

J. Bürgers (Königsberg i. Pr.):

Man erzielt bei der bakteriologischen Stuhldiagnose weit bessere Resultate, wenn man von den Platten auch Zwergkolonien absicht, welche auf den ersten Blick wie Kokkenkolonien aussehen. Den Widal sollte man öfters anstellen, wobei man spezifische Kurven erhält.

Kruse (Leipzig) Schlußwort.

R. Prigge (Schlußwort): **Bakteriologie, Immunbiologie und Epidemiologie der Bazillenruhr.**

In den Mitteilungen von Herrn Siegl über die ausgezeichneten Wirkungen des durch die üblichen Immunisierungsmethoden gewonnenen, vorwiegend anti-„toxischen" Dysenterieserums gegenüber den bei der Shiga-Kruse-Ruhr auftretenden Intoxikationserscheinungen erblicke ich eine wertvolle Stütze für die Auffassung, daß das „Toxin" in der Tat als Ursache der Allgemeinvergiftung aufzufassen ist. Sodann möchte ich darauf hinweisen, daß Angaben über die Dosierung des Serums, welche in „Kubikzentimetern" ausgedrückt sind, nicht länger als ausreichend angesehen werden können; die Wirkungen lassen sich nur dann einwandfrei beurteilen, wenn die Anzahl der injizierten Antitoxineinheiten bekannt sind: wenn wir z. B. 100 ccm des üblichen 200fachen Serums verabfolgen, so sind hierin 20000 AE enthalten, während mit 100 ccm eines modernen 1000fachen Serums eine fünfmal so große Menge des wirksamen Agens, nämlich 100000 AE eingespritzt werden. Das sind Unterschiede, an denen wir im Interesse der Kranken und im Interesse einer objektiven Beurteilung der antitoxischen Serumtherapie in Zukunft ebensowenig werden vorbeigehen können wie bei der Diphtherie.

Die Serumindustrie wird sich in Zukunft bemühen müssen, Sera herzustellen, die nicht nur anti-„toxische“, sondern auch eine gewisse anti-„endotoxische“ Wirksamkeit besitzen. Erst solche Präparate rechtfertigen die Hoffnung auf einen weiteren Ausbau der Serumtherapie bei Bazillenruhr. In besonderem Maße gilt dies für die durch Flexner-, Kruse-Sonne- und Schmitz-Bazillen verursachten Erkrankungen. Hier kommt eine spezifische anti-„toxische“ Therapie überhaupt nicht in Betracht, weil diese Keime kein „Toxin“ produzieren: wenn überhaupt, können ihnen gegenüber nur solche Seren spezifisch wirksam sein, die gewisse Mengen von Anti-„Endotoxin“ enthalten (auf die Bedeutung der Bakteriolysine und anderer Antikörper sei in diesem Zusammenhang nicht eingegangen).

Herrn Schmidt-Marburg mache ich darauf aufmerksam, daß die im Tierversuch auftretenden Wirkungen des Toxins und des Endotoxins sich doch scharfer unterscheiden lassen, als er annimmt. Gereinigte Endotoxin-Präparate verursachen in der Tat keinerlei neurotoxischen Symptome; bei genauer Beobachtung der Versuchstiere laßt sich feststellen, daß das Endotoxin zwar gewisse marantischen Erscheinungen bewirkt, die mit nervosen Prozessen verwechselt werden könnten, aber niemals echte Extremitatenlähmungen, wie sie das Toxin erzeugt.

Herrn Clauberg stimme ich vollinhaltlich zu, wenn er die Bedeutung der Rezeptorenanalyse betont und fordert, daß die Stämme stets moglichst früh nach der Isolierung geprüft werden müssen. Als Grundlage der praktisch-diagnostischen Beurteilung und der Klassifizierung ist in erster Linie der intakte Bazillus zu erachten, der das vollwertige O-Antigen enthalt, während die „verrauhten“ bzw. endotoxinfrei gewordenen Stämme solange von minderem Interesse bleiben, wie wir über die gegenseitige Beziehung der Rezeptoren O und o nichts Näheres wissen. Auf die hier noch bestehende Lückenhaftigkeit unserer Kenntnisse habe ich ja ausdrücklich hingewiesen. Allerdings dürfte die Rezeptorenanalyse erst dann ihre volle Bedeutung gewinnen, wenn an Stelle der nur serologisch definierten Antigene chemisch einheitliche Korper studiert werden können, wie es durch die neuen Forschungen — wenigstens in gewissen Fällen — moglich geworden ist.

6. H. A. Gins (Berlin).

Untersuchungen über den bakteriellen Anteil an der kariösen Zahnzerstörung [1]).

Mit 3 Abbildungen im Text.

Die Versuche, Zahnkaries durch Bakterienwirkung zu erklären, gehen auf W. D. Miller zurück, welcher schon um 1890 eingehende Untersuchungen über das mikroskopische Bild der verschiedenen pathologischen Prozesse in und an den Zähnen durchgeführt hat. Aus seinen Arbeiten ist diejenige wichtige Tatsache schon deutlich zu entnehmen, die in den folgenden Jahrzehnten für das Schicksal der Bakteriologie der Mundhöhle maßgebend geworden ist. Miller gab ein gutes Uebersichtsbild über die zahlreichen Bakterienarten, die er z. B. in kariösem Zahnmaterial sah, die er aber mit keinem der damals zur Verfügung stehenden Mittel züchten konnte. Wenn man die bekannten pathogenetischen Forderungen von R. Koch auf diese Arbeiten anwendet, dann ist es Miller nur bezüglich der ersten Forderung gelungen, befriedigende Befunde zu erheben: Die Bakterien waren in der Tat so reichlich vorhanden, daß ihre Anwesenheit die pathologischen Veränderungen wohl zu erklären vermöchte. Ob es aber immer dieselben Arten waren, konnte er mangels Reinkultur nicht entscheiden, und die Prüfung im Tierversuch war überhaupt nicht in Betracht zu ziehen.

1) Aus der Pockenabteilung des Instituts Robert Koch, Berlin (Abt.-Direktor: Prof. H. A. Gins).

Das weitere Schicksal der Bakteriologie der Mundhöhle ist bekannt. Es wurden zahlreiche Bakterienarten späterhin isoliert, die fast alle zur Gruppe der aerob wachsenden Arten gehörten. Unter ihnen fanden einige Arten größeres Interesse und wurden in mehr oder weniger enge Beziehungen zu der Karies gebracht. Hierzu gehören insbesondere der Streptococcus lacticus und die azidophilen Bazillen. Beide Arten wurden als die Karieserreger angesehen und zumal die letztere Art von amerikanischen Autoren sogar schon zum Inhalt ausgedehnter epidemiologischer Untersuchungen über die Verbreitung des Bac. acidophilus in gesunden und kranken Mundhöhlen gemacht. Eine neue Nachprüfung dieser Versuche in Deutschland durch Zillgitt hat ergeben, daß der Bac. acidophilus ein nahezu ubiquitär verbreiteter Keim ist, der keine pathogene Bedeutung beanspruchen kann. Die Versuche von Bunting und seinen Mitarbeitern, durch Einlegen von Zähnen in Azidophiluskulturen Karies künstlich zu erzeugen, haben keinen Fortschritt gebracht; denn die entstehenden Veränderungen waren ganz anderer Art als die klinische Karies.

Einzelne Bakteriologen sind sich nach wie vor darüber im klaren geblieben, daß der auffallende Unterschied zwischen dem mikroskopischen Bild des kariösen Materials und dem Züchtungsergebnis einmal ausgeglichen werden muß und daß von einer abschließenden Erforschung dieser Flora nicht gesprochen werden konnte. Es sind daher zu allen Zeiten auch Versuche gemacht worden, unter Verwendung neuer Züchtungsverfahren einen weiteren Einblick in die Mund- und Zahnflora zu erlangen. Daß hierbei auch die Verfahren zur Anaerobenzüchtung eine Rolle spielten, ist verständlich. Die Ergebnisse sind jedoch so ungleichmäßig und so unregelmäßig gewesen, daß irgendwelche Schlüsse nicht gezogen werden konnten. Es sind sowohl anaerobe sporentragende wie nichtversporende Formen gelegentlich gefunden worden, ihr Nachweis gelang aber so selten, daß sie in der Regel als Einzelbeobachtung veröffentlicht worden sind. Selbst zu einer brauchbaren Arbeitshypothese über die Entstehung der Zahnkaries konnten diese verstreuten Befunde nicht dienen, und es blieb daher kaum etwas anderes übrig, als das bakterielle Moment bei der Kariespathogenese mehr oder weniger auszuschalten und das Heil in anderen Theorien zu suchen.

Bei dem augenscheinlich endgültigen Versagen der Bakteriologie bezüglich der Aufklärung von Karies und anderen Erkrankungen innerhalb der Mundhöhle war es verständlich, daß die Bedeutung der dort anwesenden Bakterien immer geringer eingeschätzt wurde, bis endlich der Zustand der letzten Jahre erreicht war, in welchem der Gedanke einer bakteriellen Aetiologie von Karies oder Paradentose auf mehr oder weniger entschiedene Ablehnung stieß. Wenn Miller seinerzeit die Karies noch als einen „chemisch-parasitären" Prozeß bezeichnet hatte, so war der „parasitäre" Anteil nahezu ganz unter den Tisch gefallen und der „chemische" nahm einen erheblichen Umfang an. Auf die zur Zeit am weitesten verbreiteten Karies-Theorien einzugehen, ist hier nicht der Ort. Eine einzige Feststellung ist aber notwendig; Wenn auch die Ernährungstheorien verschiedener Prägung und ebenso die chemischen Theorien den derzeitigen Verhältnissen in den Kulturvölkern gerecht zu werden scheinen, so haben sie doch keinen gangbaren Weg gewiesen, auf welchem man zu einer Einschränkung der Kariesverbreitung hätte gelangen können.

Das Kariesproblem bleibt also nach wie vor eines derjenigen Probleme der Gesundheitsführung, welches noch recht weit von der Lösung entfernt zu sein scheint.

Die Notwendigkeit, eine neue bakteriologische Analyse der Karies mit neuen Methoden durchzuführen, bedarf daher an sich keiner Begründung. Es war nur zuerst nachzuweisen, daß eine solche Analyse Befunde ermöglicht, die bisher noch nicht erhoben werden konnten. Das ist durch die Arbeiten auf meiner Abteilung in den letzten 10 Jahren ausreichend geschehen; denn wir konnten die Kenntnisse über die Zusammensetzung der Mundhöhlenflora dadurch sehr wesentlich erweitern, daß wir eine beträchtliche Zahl von anaerob wachsenden Bakterien ohne Sporenbildung zum erstenmal reinzüchten und den Nachweis führen konnten, daß deren Reinzüchtung bei geeigneter Technik regelmäßig gelingt. Damit war ein großer Fortschritt erzielt, und es konnte die systematische Erforschung der Mundflora unter den verschiedensten Bedingungen in Angriff genommen werden.

Soweit die Karies hier in die Untersuchungen einbezogen war, stellte sich sehr bald heraus, daß die bisherigen Annahmen über das bakteriologische Bild nur sehr wenig Stütze an dem tatsächlichen Befund fanden. Die Uebereinstimmung unserer Züchtungsergebnisse mit dem mikroskopischen Bild des kariösen Materiales mußte darauf hinweisen, daß die Beziehungen der zahlenmäßig durchaus überwiegenden anaeroben Arten zu dem kariösen Prozeß enger seien, als bisher glaubhaft gemacht werden konnte. Damit aber trat die wichtige Frage auf, ob diese Bakterienarten etwa an der Zerstörung des Zahnbeins beteiligt seien. Zur Klärung dieser Frage standen nicht sehr viele Wege offen. Der Tierversuch mußte von vornherein ausscheiden; denn es ist im Lauf der Jahre bereits eindeutig festgestellt worden, daß die Reinkulturen unserer Anaerobier bei Meerschweinchen und Kaninchen keinerlei Krankheitszeichen veranlaßten, auch wenn sie in das Zahnfleisch eingespritzt worden waren. Sie kommen aber auch unter natürlichen Bedingungen bei diesen Tieren nicht oder nur in ganz geringer Verbreitung vor, so daß wohl von einer natürlichen Resistenz dieser Tiere gesprochen werden darf.

Versuche, Karies an gesunden Zähnen zu erzeugen, schienen wenig aussichtsreich, solange noch gar keine Unterlagen dafür vorhanden waren, welche Arten als besonders verdächtig zu betrachten seien und solange es unbekannt war, ob es sich um die Wirkung einer einzigen Art oder einer Gruppe von mehreren Arten handeln konne. Auch mußte ja, in Uebereinstimmung mit den zahnärztlichen Erfahrungen, mit der Tatsache gerechnet werden, daß keineswegs die Zähne aller Menschen in gleicher Weise kariesempfänglich sind, und es fehlt bisher jeder Anhaltspunkt, an welchem man z. B. einen noch gesunden Milchzahn als kariesempfänglich erkennen könnte.

Unter diesen Umständen haben wir uns zu einem Vorgehen entschlossen, das mit aller Wahrscheinlichkeit eine Teillösung des Problems bringen mußte: Wir haben das Schicksal der Karies außerhalb der Mundhöhle verfolgt, d. h. an extrahierten Milchzähnen. Ein solcher Versuch konnte weitere Aufschlüsse bringen, wenn die in und an dem Zahn vorhandene Bakterienflora möglichst ungestört blieb. Und die Bedeutung der anaeroben Keimarten, die ja bisher noch niemals in die systematische Kariesforschung einbezogen waren, konnte nur dann erkannt werden, wenn die Zähne außerhalb des Körpers unter streng anaeroben Bedingungen gehalten waren. Weiterhin aber war es auch nötig, die Zähne unter solchen Umständen zu halten, daß eine Nährstoffzufuhr für die in der Karies nistenden Bakterien von außen her mit Sicherheit unterbunden blieb. Unser Gedanke bei diesem Vorgehen war der folgende: Wenn die anaeroben Arten überhaupt die Fähigkeit haben, das Zahngewebe anzugreifen und die

Zerfallsprodukte zu assimilieren, dann mußte diese Erscheinung noch eine Zeitlang außerhalb des Körpers möglich sein, wenn anaerobe Bedingungen erhalten blieben. Diejenigen Bakterienarten aber, die hierzu nicht in der Lage sind, mußten dann schließlich an Nahrungsmangel zugrunde gehen.

Hier konnte der Einwand gemacht werden, daß wir ganz andere Verhältnisse geschaffen haben, als sie in der Mundhöhle vorhanden sind, in welcher bekanntlich niemals streng anaerobe Verhältnisse herrschen. Dieser Einwand wird aber schon durch den Hinweis auf die Tatsache widerlegt, daß die Anaerobier in der lebenden Mundhöhle sogar sehr gute Wachstumsbedingungen vorfinden, wie ja ihr regelmäßiger Nachweis zeigt. Wie ihr Stoffwechsel im lebenden Gewebe vor sich geht, wissen wir noch nicht, müssen aber annehmen, daß sie aus den Körpersäften auch bei Sauerstoffanwesenheit bestimmte Nährstoffe aufnehmen können. Außerhalb des Körpers aber können wir sie nur unter denjenigen Bedingungen zum Wachstum bringen, die wir als „Anaerobiose" bezeichnen. Die Körpersäfte, die dem im Kiefer sitzenden Zahn ständig zugeführt werden, haben aber bei unserer Versuchsanordnung gefehlt und die anaeroben Arten waren in der Tat ausschließlich auf die Nährstoffe angewiesen, die im extrahierten Zahn noch vorhanden waren.

Zur Herstellung anaerober Verhältnisse verwendeten wir das Fortnersche Verfahren, also dasjenige, welches uns seither regelmäßig die besten Züchtungserfolge gebracht hatte. Die Versuche wurden so geplant, daß die anaerob im Brutschrank gehaltenen Zähne in Abständen von etwa 6—8 Wochen angesehen und bakteriologisch untersucht werden sollten. Sie wurden bei der ersten Versuchsreihe, so wie sie aus der Mundhöhle entnommen waren, also ohne jede äußere Desinfektion, auf den sterilen Teil einer Blutplatte gelegt, deren eine Hälfte in der üblichen Weise mit Bact. prodigiosum beschickt war. Diese Technik hat sich als unzweckmäßig erwiesen; denn die Zähne waren nach einigen Wochen mehr oder weniger vertrocknet. Wo das Wasser in den luftdicht abgeschlossenen Fortnerplatten hingekommen ist, weiß ich auch jetzt noch nicht, muß aber annehmen, daß es von der Prodigiosus-Kultur verbraucht wird.

Um diesen Mangel auszuschalten, haben wir dann eine andere Technik entwickelt, die sich bisher gut bewährt hat. Die entnommenen Zähne werden jetzt in kleine Glaswannen in sterilisierten Seesand eingebettet und dieser mit sterilem Leitungswasser gut angefeuchtet. Außer dem Wasser werden dem Zahn keinerlei Nährstoffe zugeführt, und die Austrocknung ist für lange Wochen vermieden.

Unsere Erfahrungen mit solchen anaerob aufbewahrten Zähnen erstrecken sich jetzt über 15 Monate. Sie betreffen zum Teil kariöse Milchzähne, zum Teil gesunde Milchzähne und Milchzähne mit einzelnen kariösen Herden, bei welchen wir an gesunden Stellen den Schmelz leicht angefeilt haben.

Das Ergebnis dieser Versuche war folgendes:

1. Die gesunden Milchzähne wiesen nach einem Jahr keinerlei Veränderungen auf. Die abschließende bakteriologische Untersuchung ergab, daß sie praktisch frei von Vertretern der anaeroben Mundflora waren. Auch die mannigfachen Vertreter der „Durchgangsflora", d. h. der banalen Mundflora, waren nicht mehr nachweisbar. Nur ein Stamm von anaeroben sporenbildenden Stäbchen war nachweisbar. Sie dürfen als nachträgliche Verunreinigung betrachtet werden, da sie bei früheren Untersuchungen nicht gefunden worden sind.

2. Bei den kariösen Zähnen wurden Veränderungen verschiedener Art beobachtet. Am auffallendsten waren sie bei Zahn 1. Dieser Zahn zeigte

vor dem Einlegen in die Fortnerplatte eine umfangreiche einseitige Kronenkaries. An der gegenüberliegenden Seitenfläche fanden sich eine kaum sichtbare beginnende Karies und daneben eine Auflagerung mit Verfärbung, aber ohne jeden Substanzverlust. Nach etwa 4 Wochen Aufenthalt im Brutschrank zeigte es sich, daß der Verschluß der Platte gelöst war. Der Nährboden und der Zahn waren völlig vertrocknet. Eine bakteriologische Untersuchung lieferte lediglich einen aerob wachsenden Aktinomyzeten. Von den anaeroben Bakterien war nichts mehr nachweisbar. Der Zahn wurde mit steriler Kochsalzlösung angefeuchtet und dann die alte Karies von einem anderen kariösen Zahn neu infiziert. Nach weiteren 3 Monaten Aufenthalt in sterilem Seesand hatte sich an der Stelle der einen Verfärbung eine etwa 1 mm große Karies entwickelt. Nach einigen weiteren Monaten war auch an der zweiten Verfärbung eine deutliche Karies vorhanden.

Aehnliche Beobachtungen waren auch an mehreren anderen Zähnen zu machen. Kleinste, kaum sichtbare, Karies in der Nähe der ursprüng-



Abb. 1. Milchzahn 10, extrahiert am 5. April 1938, in Seesand eingelegt am 5. April, photogr. am 30. Mai 1938.

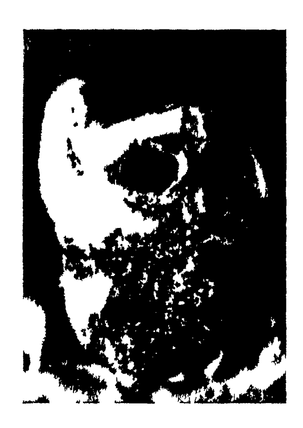


Abb. 2. Milchzahn 10, photographiert am 1. September 1938.



Abb. 3. Milchzahn 10, photographiert am 8. Februar 1939.

lichen umfangreichen Kavität war deutlich größer geworden, Schmelzbrücken, die zwischen den beiden Stellen vorhanden waren, brachen ein und in mehreren Fällen traten an unscheinbaren rauhen Stellen kariöse Veränderungen auf, die 1 bis 2 mm tief in das Zahnbein vorgedrungen waren. Nach etwa 9 Monaten waren die Veränderungen zum Stillstand gekommen (s. Abb.).

Die bakteriologische Untersuchung, die im Lauf der Monate mehrmals wiederholt worden war, hatte insofern ein einheitliches Ergebnis, als schon nach 3—4 Monaten die Vertreter der banalen Mundflora fast völlig verschwunden waren. Auf den aerob angelegten Platten fanden sich nur noch grampositive Stäbchen aus der Gruppe des Bac. mesentericus. Bei der anaeroben Verarbeitung aber erzielten wir in fast allen Fällen, selbst nach mehr als **6** Monaten noch Kulturen des Bact. melaninogenicum und verschiedener Formen der Leptothrix. Als besonders zäh erwies sich Leptothrix fragmentata (bisher als Gi XV n. sp. bezeichnet).

3. Bei denjenigen Zähnen, an welchen der Schmelz angefeilt worden war, hatten sich an diesen Stellen keinerlei Veränderungen gezeigt. Eine Infektion

des angefeilten Schmelzes hatte nicht stattgefunden. Dagegen waren die kariösen Herde an denselben Zähnen aktiv geblieben und verhielten sich ebenso, wie bei den anderen Zähnen beobachtet worden war.

Welche Folgerungen sind nun aus diesem Ergebnis zu ziehen?

Die Vergrößerung bereits vorhandener kariöser Stellen, viel mehr aber noch die Entstehung von kariösen Substanzverlusten an Stellen, die ursprünglich sicher keine Karies hatten, ist nur durch die Lebenstätigkeit der dort vorhandenen Bakterien zu erklären. Chemische Umsetzungen, die von sich aus den Zahn zerstören könnten, sind nicht zu erwarten. Sie hätten außerdem bei den zahllosen Versuchen, die bisher an kariösen Zähnen gemacht worden sind, nicht verborgen bleiben können. Die Tatsache, daß die erwähnten Veränderungen, die von uns zum erstenmal beobachtet werden konnten, sich unter anaeroben Bedingungen entwickelt haben, spricht ganz eindeutig für die Bedeutung der anaeroben Bakterien bei der kariösen Zahnzerstörung. Und unter diesen scheinen besonders die anaeroben Leptotricheen von Bedeutung zu sein.

Die klinische Zahnkaries ist damit als das Ergebnis einer bakteriellen Infektion zu betrachten.

Unsere Versuchsergebnisse bestätigen also die Vermutung, die schon vor nahezu 50 Jahren geäußert worden ist, aber damals nicht experimentell gestützt werden konnte. Sie stehen anscheinend in scharfem Gegensatz zu der Meinung, die in der Gegenwart die größte Verbreitung gefunden hat und die von Gordon vor wenigen Jahren mit folgenden Worten beschrieben hat:

„Die Zahnkaries ist als ein „Krankheitskomplex" anzusehen, an dessen Zustandekommen sich zahlreiche Momente beteiligen konnen, und zwar nicht nur „äußere" (vor allem Ernährung, dann Klima, Wohnort usw.) sondern auch „innere" bzw. endogen bedingte Faktoren (Vererbung, Konstitutionstypen, Störungen in der „inneren Sekretion", allgemeine Gesundheitsstorungen, konstitutionelle Schwäche usw.), wenn es auch richtig ist, daß bereits der chronische, auch zu Mineralstoffwechselstorung fuhrende Vitaminmangel allein hier eine große Rolle zu spielen scheint. Der einzelne Faktor, so groß seine Bedeutung auch sein mag, reicht aber allein bzw. ohne Mitwirkung anderer Momente zu einer genügenden Erklärung des ganzen Kariesproblems nicht aus.

Die Theorie von Miller, die die Zahnfäule als ein „chemisch-parasitäres" Leiden des Zahnes auffaßt, kann weder Gesetzmäßigkeiten im Auftreten dieses Uebels, noch nachherige „Remineralisation" des Schmelzes und noch vieles andere erklären; sie kann überhaupt einer ernsten Kritik nicht standhalten." (Veroffentl. a. d. Geb. Med.verw., Bd. 46, 175, 1936.)

Die hier wiedergegebene höchst komplizierte Theorie der Kariesentstehung verdankt augenscheinlich der Tatsache ihre Entstehung, daß die wahren Ursachen der Zahnzerstörung bisher eben noch nicht bekannt waren. Es ist daher kurz zu erörtern, ob die Auffassung, welche sich aus unseren Ergebnissen entwickeln läßt, notwendigerweise im Gegensatz zu der obigen Theorie — denn auch die Gordonsche Definition ist ja vorläufig noch nicht bewiesen — steht. Hierzu ist auf einige Tatsachen zurückzugreifen, welche schon früher durch meine Mitarbeiter festgestellt worden sind.

Diejenigen anaeroben Bakterien, welche wir nunmehr in unmittelbaren Zusammenhang mit der Zahnzerstörung bringen müssen, sind uns als pathogene Arten bereits gut bekannt. Wir haben sie in vielen Fällen, die klinisch als Aktinomykose geführt waren, unter Umständen gefunden, die ihre Beteiligung an dem Krankheitsprozeß nicht zweifelhaft sein ließen, und wir haben spezifische serologische Reaktionen zwischen dem Patientenserum und diesen Arten gesehen, wie sie nur bei menschenpathogenen Bakterien aufzutreten pflegen. Ihr beschränkter Lebensraum — das lebende menschliche Organ-

gewebe — stellt sie zu den echten Parasiten im Sinn der Definition von R. Koch:

„Wie wir gesehen haben, wachsen die Tuberkelbazillen nur auf einem bestimmten Nährboden. Geringe Abänderungen des letzteren können schon ein Nichtwachsen der Bazillen bedingen. Es ist das ein Verhalten, welches uns täglich bei allen Mikroorganismen, besonders den pathogenen, begegnet. Es ist außerdem eine Beobachtung, die wir ganz allgemein bei Parasiten machen; der Bandwurm ist z. B. so auf seinen Wirt angewiesen, daß man ihn nur bei einer gewissen Tierspezies findet. Je mehr ein Organismus nun zum reinen Parasiten wird, um so empfindlicher verhält er sich gegen den Nährboden." (Die Aetiologie der Tuberkulose, Berl. klin. Wschr. 1882, Nr. 15.)

Das trifft für die anaerobe Mundflora ,die ja, wie schon erwähnt, außerhalb des menschlichen Körpers, bzw. ohne Beziehung zu ihm, von uns nicht gefunden wurde, entschieden zu.

Zweifellos handelt es sich aber um eine Flora, die in allen menschlichen Mundhöhlen vorhanden ist und die wir auch in anderen Organen, z. B. in der erkrankten Appendix, gefunden haben. Wird nicht durch diese Tatsache schon die Möglichkeit einer pathogenen Bedeutung ausgeschaltet? Seitdem wir den Begriff der „stummen Infektion" kennen und richtig bewerten gelernt haben, trifft dies nicht mehr zu. Wir begegnen auf Schritt und Tritt, in der menschlichen Pathologie sowohl wie in dem Laboratorium den sogenannten „mobilisierten" Infektionen. Wir nehmen an, daß derartige „stumme Infektionen" in einem Organismus von normaler Resistenz unsichtbar bleiben, daß sie aber zur Manifestation kommen können, wenn durch irgendwelche Aenderung der Lebensbedingungen die Resistenz sinkt und damit das biologische Gleichgewicht zwischen Körperzelle und Parasit gestört worden ist. Als charakteristische Eigenart der stummen Infektion betrachten wir weiterhin die Tatsache, daß uns der Zeitpunkt der Infektion völlig unbekannt bleibt, so daß der Ausbruch der Erkrankung das erste Zeichen der vorhandenen Infektion ist.

Bezüglich der anaeroben Mundflora sind wir in dieser Hinsicht sogar schon weiter gekommen, als es bei vielen anderen „stummen Infektionen" der Fall ist; denn wir wissen, daß der zahnlose Säugling noch frei von dieser Flora ist, und daß sie sich erst nach dem Durchbruch der ersten Zähne allmählich ansiedelt. Als Infektionsquelle wird auf Grund unserer bisherigen Feststellungen wahrscheinlich nur die Mundhöhle von Erwachsenen in Frage kommen. Und damit kommen wir jetzt zu einer Auffassung von der Entstehung der Karies, die sich folgendermaßen formulieren läßt:

Die Zahnkaries beruht auf einer bakteriellen Infektion, deren Verlauf sich, wie bei allen anderen Infektionen auch, von den Wechselwirkungen der Aggressivität der Bakterien und der Resistenz des Körpergewebes abhängig zeigt. Demgemäß kann die pathogene Flora in der Mundhöhle ungefährlich bleiben, wenn die Geweberesistenz voll erhalten ist. Im Fall einer Resistenzschädigung gewinnt vor allem die anaerobe Flora pathogene Eigenschaften, die sich klinisch als Gewebezerstörung zeigen.

Zur Verminderung der Widerstandsfähigkeit können alle diejenigen Ursachen führen, welche von Gordon angeführt hat. Es ist also nicht möglich, einen Gegensatz zwischen der bisherigen und der hier vorgetragenen Auffassung zu konstruieren, sondern es ergeben sich jetzt manche neue Möglichkeiten, die Pathogenese der Infektionen in der Mundhöhle und ihrer Einwirkung auf den ganzen Organismus zu verstehen.

Wir müssen auf Grund unserer bisherigen Erfahrungen annehmen, daß die Anwesenheit der anaeroben Mischflora in der Mundhöhle die Vorbedingungen für das Auftreten von Zahnkaries ist. Diese Annahme ist gut begründet und könnte nur dadurch als falsch erwiesen werden, daß der Nachweis von Karies ohne Anwesenheit dieser anaeroben Flora geführt wird. Wir glauben nicht, daß sie in Deutschland vorhanden sein wird, müssen aber bezüglich der Verhältnisse in anderen Ländern oder Kontinenten mit dem Urteil zurückhalten.

Aus unseren experimentellen Erfahrungen ergeben sich schon jetzt ganz bestimmte Vorstellungen von den Wegen, die bei einem systematischen Kampf gegen die Verbreitung der Karies gegangen werden müssen: Wenn die schon im Gang befindlichen Bestrebungen zur körperlichen Ertüchtigung der Jugend durch Gymnastik und zweckmäßige Ernährung in Zukunft dadurch unterstützt werden, daß die Ansiedlung der anaeroben Krankheitserreger in der Mundhöhle des Kleinkindes verhindert oder wenigstens stark gehemmt wird, dann muß sich folgerichtig schon nach einer Zeitspanne von etwa zehn Jahren ein deutlicher Rückgang der Karieshäufigkeit bemerkbar machen. Das ist nach meiner festen Ueberzeugung keine Utopie mehr, sondern ein Fortschritt, der mit derselben Sicherheit erreicht werden kann, wie der Rückgang der Tuberkulose in den letzten Jahrzehnten!

Aussprache.

Prof. A. Azzi und Dozent Mela Benedetto (Turin):

Ich beziehe mich auf den interessanten Bericht von Prof. Gins über die bakterielle Beteiligung an der kariosen Zerstorung der Zahnkronen und möchte kurz über die in dieser Beziehung unter Leitung von Prof. Azzi im Hygienischen und Mikrobiologischen Institut der königlichen Universitat in Turin erfolgten Untersuchungen berichten. Dabei wurde besonders seitens Dr. Nasi das Säurevermögen der Streptokokkenstämme aus Speichel von Individuen mit zahlreichen kariosen Zähnen, sowie aus Speichel von Individuen mit gesunden Zähnen studiert. Die verschiedenen Stämme wurden auf Glukosebrühe mit bestimmtem pH nahe an 7, d. h. am Neutralpunkt, kultiviert. Nach 12, 24, 48, 60 Std. wurde der pH-Wert ermittelt.

Dabei wurden zwei Typen von Streptokokken ermittelt, und zwar ein Typ trübte die Glukosebruhe und erzeugte darin Säure, die bis zu pH 4,8 reichte, während der andere Typ die Bruhe nicht trübte, aber einen flockigen Niederschlag am Boden hinterließ, und Säure bis zu pH 6,4 erzeugte. Dabei wurde die Beobachtung gemacht, daß die Stämme, welche die Brühe trubten, und die stärker säureerzeugend waren, vorwiegend in dem Speichel von Personen mit kariosen Zahnen vorgefunden wurden.

Erst weitere und eingehendere Untersuchungen werden den Wert unserer Beobachtungen ermitteln konnen. Wir sind der Meinung, daß die Zahnkaries durch die Bakterienflora der Mundhohle beeinflußt werden kann, aber daß der wahre Ursprung dieses Vorganges durch trophische Störungen bedingt ist, und zwar durch eine Schwachung (Entkalkung usw.) der Zähne. Die größere Verbreitung der Zahnkaries unter den Kulturvolkern beweist uns, daß der Gebrauch von präparierten und raffinierten Speisen die Zähne weniger in Anspruch nimmt, so daß sich diese durch den verminderten Gebrauch schwächen und infolgedessen leichter für die Zahnkaries aufnahmefähig werden.

Prof. Azzo Azzi u. Privatdozent Giovanni Pejrone (Turin, Hygienisches u. Mikrobiologisches Institut der Kgl. Universität von Turin), **Ueber die Beziehungen zwischen Zahnkaries und bakteriologischem oralen Index.**

Nachdem Prof. Gins über die Wirkung der Bakterien auf die Zahnkaries berichtet hat, halte ich es für interessant, Ihnen die Ergebnisse eigener Untersuchungen, die sich auf die behandelte Frage beziehen, mitzuteilen.

Meine bakteriologischen Untersuchungen betreffen die quantitative Prüfung der bakteriellen Flora in der Mundhöhle unter verschiedenen Bedingungen, und zwar auch bei der

Zahnkaries. Um exakte vergleichende Werte unter den verschiedenen quantitativen Prüfungen zu gewinnen, habe ich eine neue Methode, und zwar die des bakteriologischen oralen Indexes (B.O.I.) ausgearbeitet, welcher als Einheit für alle quantitativen bakteriologischen Untersuchungen dienen sollte.

Ich habe mich bemuht, diesen Ausgangspunkt exakt festzustellen, da, meiner Meinung nach, dies besonders wichtig ist, wenn auch in zahlreichen bakteriologischen quantitativen Untersuchungen viele Verff. diesen Punkt vernachlassigen.

Die Methode, die ich für die Bestimmung des bakteriologischen oralen Indexes des Mundes ausgearbeitet habe, besteht im folgenden Verfahren:

1. Die Bakterien werden in 75 ccm steriler physiologischer Losung, welche auf drei je 15 Sekunden dauernden Mundspülungen verteilt wird, aufgenommen.
2. Die Homogenisierung der bakterienhaltigen Losung besteht in einer wenigstens 5 Minuten dauernden starken Erschütterung des die 75 ccm Spülungsflüssigkeit fassenden Gefaßes.
3. Die aufgenommene Spulflussigkeit wird 1/100000 verdünnt.
4. 1 ccm der oben erwähnten Verdünnung wird
5. auf Platten von Agar-Kaninchenblut ausgesät, und
6. 48 Std in Thermostat (37°) gelassen.
7. Darauf werden die Kolonien gezahlt.

Ich werde nicht auf die Veränderungen des bakteriologischen oralen Indexes, sei es bei verschiedenen Ernahrungen (Kohlenhydrate, Fette, Fleisch) und beim Fasten, sei es bei taglicher Behandlung mit antiseptischen Mundwässern oder bei Unterlassung derselben, sei es in bezug auf die reinigende Wirkung von sterilen Flussigkeiten eingehen.

Auch werde ich nicht das verschiedene Verhalten des bakteriologischen oralen Indexes in den vollig zahnlosen Mundhohlen, in denjenigen mit metallischen und nichtmetallischen, festen oder abnehmbaren Prothesen beschreiben.

Der bakteriologische orale Index des Mundes ist bei sehr kariosen Zähnen erheblich erhöht, und zwar ca. 1/4 uber die Norm. Hohere Schwankungen wurden auch bei kariosen Zähnen im Verhaltnis zum gesunden Gebiß in den verschiedenen Tageszeiten und nach den Mahlzeiten festgestellt.

Diese Befunde sind leicht erklärbar, da die Zahnkaries ein Schlupfwinkel für zahlreiche Bakterien ist, wahrend das Kauen bei gesundem Munde die Entfernung der Bakterien begünstigt.

Wenn die Befunde dieser quantitativen Prüfungen der bakteriologischen Flora der Mundhöhle ohne Zweifel nicht die Bedeutung der qualitativen Prüfungen und besonders der von Prof. Gins unternommenen eingehenden Untersuchungen uber die Flora des Mundes fur die Pathogenese der Zahnkaries haben konnen, nichtsdestoweniger betonen sie nochmals das enge Verhältnis zwischen Zahnkaries und bakterieller Flora.

7. O. Hettche (München):

Erfahrungen mit Kieselsäurenährböden [1]).

Mit 4 Abbildungen im Text.

Auf der letzten Mikrobiologentagung berichtete Schütz über einen aus Polyvinylalkohol hergestellten Nährboden. In der Aussprache wies ich darauf hin, daß die Herstellung des Kieselsäurenährbodens („Kiebo“) nach der von mir in Gemeinschaft mit Münch angegebenen Vorschrift (Arch. Hyg. Bd. 119, 168, 1937) wesentlich einfacher sei. Wir haben inzwischen die Herstellung des Nährbodens noch weiter vereinfacht und glauben, für einige Anwendungsgebiete in der Bakteriologie nicht nur einen Ersatz, sondern einen sehr preiswerten, dem Agar und der Gelatine sogar überlegenen „Werkstoff“ gefunden zu haben, der in Zeiten der Rohstoffknappheit sehr willkommen ist.

1) Aus dem Hygienischen Institut der Universität München (Direktor: Geh. Rat Prof. Dr. K. Kißkalt).

Wir verwenden als gelierendes Agens das Hydrat der Kieselsäure. Dieses wird zugesetzt einer Cenovis (Hefe-Gemüseextrakt)-Nährbrühe, die schon eine zur Neutralisation der Wasserglaslösung erforderliche Menge Phosphorsäure enthält. Zur Vorrathaltung kann auch eine konzentrierte Brühe-Phosphorsäurelösung bereitet werden, die unbegrenzt haltbar ist und dank ihres hohen Säuregehaltes auch gegen eine Infektion durch Sporen geschützt ist. Der Nährboden zur Bestimmung der Keimzahl im Wasser und Abwasser enthält 6 Proz., für Colizahl 8 Proz. Wasserglas. Einzelheiten sind aus unserer Arbeit (Zbl. Bakter. I Orig. Bd. 143, S. 367, 1939) zu ersehen.



Abb. 1. Agarplatte.

Das zur Förderung des Wachstums bisher unentbehrliche Pepton ist für unsere Nährböden nicht erforderlich. Durch Zusatz von 0,05 Proz. Natriumsulfit ist der gleiche Effekt zu erzielen: Die Koloniegröße wird um 50 Proz. gesteigert, auch die Keimzahl ist meist größer, da das Wachstum gefördert wird.

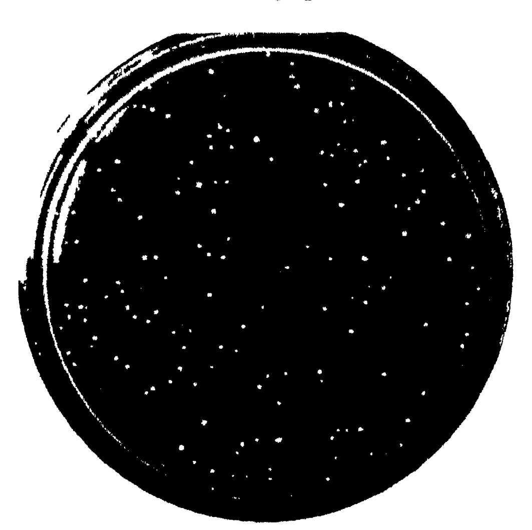


Abb. 2. Kieboplatte.

Zur Klärung der Sulfitwirkung wurde an 1proz. Cenovis-Hefeextraktbrühe das Verhalten zahlreicher Anaerobier untersucht. Dabei zeigte sich, daß schon die oben angegebene Menge von Sulfit ausreicht, um den Nährboden für Anaerobenzüchtung geeignet zu machen. Das Wachstum tritt schnell ein, die Morphologie der Stäbchen ist besser als bei der Tarozzibrühe. Die letztere kann in der Brauchbarkeit durch Sulfitzusatz ebenfalls gebessert werden. Wenn man sich nach der Ursache der Sulfitwirkung fragt, so dürfte doch die Verschiebung des Redoxpotentials die Ursache sein. Wenn auch Aerobier im Wachstum gefördert werden, so beruht dies vielleicht auf der Wegnahme von sauerstoffhaltigen Zwischenprodukten, die das Wachstum hemmen.

Andere Verwendungsgebiete für die Kiebo-Nährböden sind die bakteriologische Milchuntersuchung und Stuhluntersuchung. Bei der Keimzahlbestimmung in Milch verwendeten wir zuerst den für die Keimzählung in

Wasser angegebenen Nährboden. Da bei der erforderlichen pH von 6,6 ein Sulfitzusatz unterbleiben mußte, waren die Kolonien zu klein. Wir verwenden daher jetzt Nährboden mit 0,5 Proz. Pepton und einem Gehalt an Cenovis von nur 0,1—0,2 Proz.; in diesem Bereich liegt das Optimum der Koloniegröße, die nunmehr die Größe der Agarkolonien erheblich übersteigt

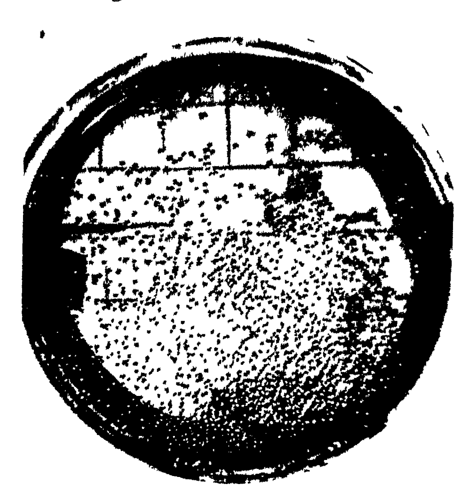


Abb. 3. Paratyphus (hell) und Coli (dunkel) auf Kieboplatte, 16stund. Kultur.

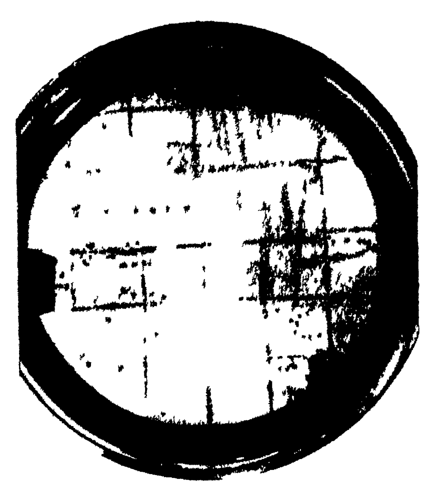


Abb. 4a. E-Ruhr auf Endoplatte.

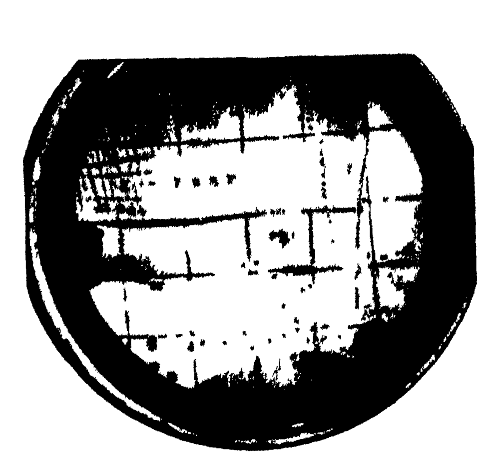


Abb. 4b. E-Ruhr auf Drigalskiplatte.

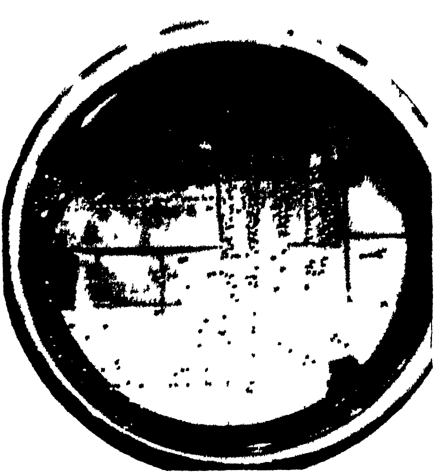


Abb. 4c. E-Ruhr auf Kieboplatte.

(Abb. 1 u. 2). Das Gel muß 7 Proz. Wasserglas enthalten; eine Trocknung ist nicht erforderlich. Die Zahl der Kolonien war entweder gleich oder übertraf etwas die Werte des Standard-Agar, der aus 0,3 g Liebig, 0,5 g Pepton, 1,0 g Laktose, 0,5 g NaCl und 1,5 g Agar auf 100 ccm Nährboden besteht. Die Bestimmung der Colizahl in Milch erfolgt in gleicher Weise wie bei der Wasseruntersuchung angegeben.

Die größte Menge von Agar wird wohl für die Stuhluntersuchung verbraucht. Wir haben deshalb auch hier einen Nährboden ausgearbeitet, dessen

praktische Erprobung gegenwärtig läuft. Zu 78 ccm Cenovis-Hefeextraktbruhe, die schon eine entsprechende Menge H_3PO_4 (ca. 4,4 ccm der 25proz. Saure) enthält, gibt man in der angegebenen Reihenfolge 10 ccm 20 proz. Milchzucker, 1 ccm 1 proz. Bromthylmolblau und 8 ccm Wasserglas techn. Zeigt der Indikator ein pH von 7,2 an, so wird noch 1 ccm eine 1 proz. Lösung von Alizarinzyaningrun 3 G (I.G. Farbenindustrie), sowie 0,5 ccm einer 10proz. Losung von Natriumsulfit zugefügt. Der Nährboden erstarrt bei 20° nach ungefähr 6 Minuten; durch Abkuhlung kann die Erstarrungszeit verlängert werden. In die Petrischale gibt man 15—20 ccm Nährboden. Das Gel braucht eine gewisse Zeit, bis es beimpfbar ist. Legt man Trockenfilze ein, so kann nach 7 Stunden beimpft werden. Will man ohne Filze arbeiten, so gießt man die Platten am Vorabend und trocknet am nächsten Tage 2—3 Stunden im Brutschrank.

Die Beimpfung der Platten kann, wie üblich, mit dem Drigalskispatel erfolgen. Besser bewährt hat sich aber eine große Platinöse. Bei der Betrachtung zeigt sich im Vergleich zu Drigalskiagar, daß die Hofbildung um die Colikolonien durch den indifferenten Farbstoff Alizarinzyaningrün so weit eingeengt wird, daß auch im dichten Rasen die verdächtigen Kolonien von den eigelb aussehenden Colikolonien zu unterscheiden sind. Das Wachstum ist, wie nebenstehende Aufnahmen (Abb. 3 u. 4a—c) zeigen, so gut wie auf Agar, die Durchsicht der Platten ist besser als bei Agar. Ein weiterer nicht zu unterschätzender Vorteil des Nährbodens ist der, daß Bact. proteus auf ihm nicht schwärmt. Was die Agglutinabilitat der auf Kiebo gewachsenen Bakterien anbelangt, so hat sie in der Typhus-Paratyphusgruppe nie versagt. Bei der Ruhrgruppe scheint nicht immer Agglutination einzutreten. Der Nährboden hat sich in der gegenwärtig laufenden praktischen Erprobung gut bewährt. Einzelheiten werden demnächst veroffentlicht.

Die Vorteile des Kiebo treten besonders bei den zur Untersuchung von Wasser und von Milch angegebenen Nährböden hervor: Die Herstellung ist einfach, die Ausgangsmaterialien kosten nur $^1/_6$ des Nähragar, der uns wertvolle Devisen und Fleischprodukte kostet. Da die Leistungen besser als bei Agar und Gelatine sind, dürfte sich schon aus diesen Gründen die Einführung empfehlen. Bei dem Nährboden für Stuhluntersuchung wird vielleicht anfangs die Einarbeitung etwas Zeit erfordern. Es ist aber zu wünschen, daß diese schon in einer Zeit erfolgt, wo der Vergleich der Ergebnisse mit denen auf Agar noch möglich ist.

8. Wilhelm Zimmermann (Breslau):

Demonstration neuer Nährböden als Ersatz für Agar[1]).

Seit den grundlegenden Erkenntnissen Robert Kochs über die Verwendbarkeit fester Nährböden gehört Agar-Agar zum eisernen Rüstzeug der bakteriologischen Technik. Leider handelt es sich um ein Produkt ausländischer Herkunft, dessen Einfuhr in den letzten vier Jahren mengenmäßig bereits um 50 Proz. zurückgegangen ist, von 1765 dz im Jahre 1935 auf 831 dz im Jahre 1938, wertmäßig von 524000 RM. (1935) auf 343000 RM. (1938).

1) Aus dem Hygienischen Institut der Universitat Breslau (Direktor: Prof. Dr. W. Blumenberg)

Tabelle I.
Deutschlands Einfuhr von Agar-Agar.
(Stat. Nr. 143[1]): Hausenblase, echte und unechte, z. B. Agar.)

Herkunftsland	1935	1936	1037	1938 (1. Halbjahr)	1938
Mengen in dz:					
Großbritannien .	6	2	37	38	
Japan	1679	937	918	289	
andere Staaten .	80	30	13	30	
Insgesamt	1765	969	968	357	831
Werte in 1000 RM:					
Insgesamt	524	354	410	156	343
Preis pro kg: RM	3,00	3,65	4,24	4,38	4,13

1) Stat. Nr. 143: Hausenblase einschl. Agar. Gesonderte Einfuhrzahlen für Agar liegen auch beim Statistischen Reichsamt nicht vor. Hausenblase oder Ichtyocolla ist Fischleim, die von der äußeren Haut befreite und getrocknete Schwimmblase verschiedener Acipenserarten (Schmelzschupper), zu denen der Hausen und der Stor gehören.

Das sind Zahlen, die bei der Gesamteinfuhr Deutschlands scheinbar nicht ins Gewicht fallen. Aber wenn auch Agar heute nur noch für bakteriologische und pharmazeutische Zwecke gebraucht wird und seine Verwendung als Klär- und Appreturmittel eingeschränkt ist, wenn im Augenblick auch kein fühlbarer Mangel an Agar besteht, so ist es doch keineswegs richtig, sich mit dem gegenwärtigen Zustand zu begnügen. Es muß vielmehr versucht werden, in der Bakteriologie ohne Agar auszukommen.

Es sind also Stoffe zu suchen, die sich mit wäßrigen Nährlösungen mischen, sich mit ihnen zusammen in Formen — Petrischalen — gießen lassen, dann gelatinieren oder gehärtet werden können und bei p_H 7,5 eine unterhalb 40° nicht schmelzende, durchsichtige oder durchscheinende Masse von genügender Festigkeit bilden, die zudem für Bakterien völlig ungiftig ist. Formaldehyd-, Phenol-, Harnstoff- und Glyzerinkondensationsprodukte, die heute den Kunststoffmarkt beherrschen, scheiden also aus. Eine Anfrage bei mehreren Firmen der deutschen Kunststoffindustrie ergab, daß Stoffe mit solch vielseitigen Eigenschaften offenbar nicht hergestellt werden.

Inzwischen wurden eigene Versuche aufgenommen. Als Ausgangsmaterial diente unter anderm Gelatine. Es gelingt wohl, Gelatine zu härten, so daß sie bei Körpertemperatur fest bleibt, z. B. in 5proz. Lösung mit 0,3proz. Formol, in 10proz. Lösung mit 2 Proz. Hexamethylentetramin oder 10 Proz. Azetaldehyd, es gelingt aber nicht, dieses Material zu entgiften. Auch Zusatz von Azetalen, Behandlung mit o-Oxybenzaldehyd u. a. m. war zwecklos. Aus Gemischen von mindestens 20 Proz. Gelatine mit mindestens 40 Proz. Glyzerin erhält man zwar wunderschöne, schmelzbare Massen, die alle Bedingungen erfüllen bis auf eine: Es wachsen keine Bakterien! Ebensowenig haben sich Mischungen von Gelatine mit Pektin oder Tylose bewährt.

Ueber Polyvinylalkohol als Grundlage fester Nährböden hat bereits auf der vorhergehenden Tagung Herr Prof. Schütz berichtet. Bei hohen Polyvinylalkoholkonzentrationen gelingt es auch ohne Kongorotzusatz, dessen Farbe nach einer brieflichen Mitteilung von Herrn Prof. Schütz sehr stört, geeignete farblose Platten zu gießen. Man rührt dazu 30—40 Proz.

Polyvinylalkohol[1]) mit Bouillon zu einer krümeligen Masse an, die nach dem Schmelzen gießbar ist. Beim Erhitzen entstehende Luftblasen lassen sich abzentrifugieren. Die Platten sind klar und durchsichtig, bleiben bei 37° fest, die Oberfläche ist zäh und klebrig. Das Wachstum ist gehemmt. Beim Versuch, Polyvinylalkohol in 10proz. Lösung durch Zusatz von 2—5 Proz. Borax zu härten, entstehen harte, schmelzbare Massen, die aber bei längerem Stehen schon in der Kälte Fluß zeigen und zudem kein Bakterienwachstum zulassen.

Diese Masse ähnelt damit einem von der I.G. Farbenindustrie überlassenen Produkt, das als „PVM" bezeichnet wird.

Ueber Pektin wurde bereits berichtet (Zbl. Bakter. I Orig. Bd. 143, 142, 1938). Sicher liegen hier noch Möglichkeiten offen, um auch bei pH 7,5 fermentativ zu festen Gelees zu kommen. Einige Versuche mit verschiedenen Lipasen und Schimmelpilzextrakt mißlangen.

Ein Naturstoff, der dem Agar ähnelt, ist Fucoidin, ein Schleimstoff aus Braunalgen (Laminaria digitata). Das Produkt ist nicht im Handel, konnte auch nicht untersucht werden, da man im Winter keine frischen Algen einholen kann[2]). Unter solchen Umständen kommt auch Fucoidin kaum als Agarersatz in Frage, da es schon mengenmäßig nicht ausreicht.

Traganth, ein Schleimstoff aus kleinasiatischen Schmetterlingsblütlern, läßt sich zwar zu nicht schmelzbaren Gallerten verarbeiten, ist aber kein einheimisches Produkt, sehr teuer und gestattet kein Wachstum.

Da Agar, Pektin, Fucoidin und Traganth Abkömmlinge hochpolymerer Kohlehydrate sind, wurden weitere Stoffe aus der gleichen Gruppe untersucht.

Zunächst sei von der Zellulose berichtet. Nach Galloway (Analyst Bd. 62, 455, 1937) und Dusseau (C. r. Acad. Sci. Vol. 206, 1672, 1938) sollen Pilzkulturen (Fusarium, Aspergillus, Penicillium) auf Zellophanfolien, d. i. Zellulosehydrat, kultiviert werden können[3]). Die meisten Zellulosederivate sind wasserunlöslich, nur Zelluloseäther sind zum Teil wasserlöslich, oft auch nur in der Kälte. Die untersuchten Tylosen[4]) gelieren nun nicht, sondern quellen nur sehr stark. Es gelingt aber, dickflüssige Lösungen herzustellen, die man in Petrischalen gießen kann. Die Tylose SL 600 wird in Flocken 3—4proz. in heisse Bouillon eingetragen, nach gutem Durchrühren läßt man sie quellen, bis die Masse sich in der Kälte auflöst. In der Hitze schrumpft sie. Tylose KN 600 wird 4proz. in kalter oder heißer Bouillon angequollen und dann erhitzt. Durch Wasserentzug gelangt man dann zu festen Platten. Das Wachstum von Staphylokokken, Coli-, Typhus-, Paratyphus B-, Breslau-Gärtner-, Flexner-, E-Ruhr-, Pyocyaneus- und Milzbrandbazillen ist bei Laboratoriumsstämmen gut. Die umständliche Herstellung verbietet aber vorläufig eine Verwendung im Massenbetrieb.

Ueber Stärke wurde ebenfalls bereits berichtet[5]). Mais wird zwar noch in beträchtlichen Mengen nach Deutschland eingeführt[6]), jedoch wird seine stärkere Verwendung und der ausgedehntere Anbau empfohlen[7]). Man kann darum das Maismehl durchaus als heimisches Produkt bezeichnen. Darüber

1) Benutzt werden 2 Proben der I. G. Farbenindustrie, die mit Polyvinylalkohol H und N bezeichnet werden.

2) Briefliche Mitteilung des Forschungslaboratoriums der Norwegischen Konservenindustrie, Stavanger, Norwegen.

3) Cellophan soll nach den Angaben der deutschen Herstellerfirma Kalle u. Co , Wiesbaden, nicht faulen, nicht gären, nicht schimmeln!

4) Hergestellt von Kalle u. Co.

5) Zbl. Bakter. I Orig. **143**, 142 (1938); Klin. Wschr. **18**, 27 (1939).

6) 1938 für 178 Millionen RM. (Z. Volksernährung **14**, 30 (1939).

7) Ernährung **3**, 149 (1938).

Tabelle II.
Uebersicht über Kohlehydrate als Verfestigungsmittel.

Stoff	Gerüst	Begleitstoffe	Baustein
Agar-Agar	Kette aus pyranoiden Galaktoseresten Verknüpfung in 1,3	Schwefelsäureester, Ketose, Uronsäure	CHO HCOH HOCH HOCH HCOH H_2COH Galaktose
Fucoidin	Kette aus Galaktomethylose-schwefelsäureester (Fukose)	—	CHO HCOH HOCH HOCH HCOH CH_3 Fukose
Pektin	Kette aus pyranoiden Galakturonsäureresten Verknüpfung in 1,4	zum Teil verestert Pentosane	CHO HCOH HOCH HOCH HCOH COOH Galakturonsäure
Cellulose	Kette aus pyranoiden Glukoseresten Verknüpfung in 1,4	—	CHO HCOH HOCH HCOH HCOH H_2COH Glukose
Stärke	Kugel aus pyranoiden Glukoseresten Verknüpfung in 1,4	Amylopektin (Phosphorsäureester)	Glukose

hinaus läßt sich auch in 8—11 Proz. Mischung Kartoffelstärke verwenden, die besonders durchsichtige Massen gibt, während sich Weizenmehl nicht eignet, da die verkleisterte Masse zu weiß und undurchsichtig ist.

Wir gießen jetzt meist kalt angerührte Stärke in siedende Bouillon oder umgekehrt. Auch kann man das Gemisch im Autoklaven verkleistern und zugleich sterilisieren. Will man beim Kochen entstehende Luftblasen völlig entfernen, so wird die Masse zentrifugiert. Die Platten sind dünn zu gießen, da bei dicker Schicht das Wachstum nicht besser wird, wohl aber die Kolonien

zu feucht werden. Aus 1 Liter flüssiger Stärkebouillon lassen sich 60—80 Platten gießen, aus 1 Liter Agar 80—85 Platten. Die ganz frischen Platten sind noch zu feucht und zu klebend, nach 1—2 Tagen wird die Konsistenz fester, Endoplatten halten sich aber unbeimpft 5—6 Tage, Brillantgrünplatten sogar 14 Tage! Bei Endoplatten empfiehlt es sich, mit dem Fuchsinzusatz von 3,5 ccm pro Liter auf 2,0 ccm/Liter zurückzugehen bei reichlichem Sulfitzusatz (35 ccm 15proz. Lösung). Die Stärkeplatten werden inzwischen durch einen Mitarbeiter, Medizinalpraktikant H. Göpel, im laufenden Betrieb des Untersuchungsamtes auf der Typhus- und der Variastation ausprobiert. Die Versuche sind noch nicht abgeschlossen. Die Stärkeplatten sind insofern benachteiligt, als auf den Stationen sehr erfahrene technische Assistentinnen arbeiten, während G. sich erst neu in die Materie einarbeiten mußte. Trotz allem ist das Ergebnis recht ermutigend.

Tabelle III.
Vergleich zwischen Agar- und Stärkeplatten. Ergebnisse auf der Typhusstation.

Lfd. Nr.	Stat. Nr.	Material	Original Endoplatte		Anreicherung Endoplatte		Anreicherung Brillantgrün		Ergebnis	
			Agar	Stärke	Agar	Stärke	Agar	Stärke	Agar	Stärke
									Typhusbazillen	
1	111	Blut	.	.	+	+	.	.	+	+
2	241	Stuhl	+	—	+	—	+	—	+	—
3	365	Stuhl	+	+	+	+	(+)	+	+	+
4	369	Blut	.	.	+	+	.	.	+	+
5	454	Stuhl	+	—	+	+	(+)	+	+	+
6	463	Blut	.	.	+	+	.	.	+	+
7	501	Stuhl	+	—	+	—	+	+	+	+
8	508	Urin	—	+	.	.	.	.	—	+
9	528	Stuhl	+	—	+	+	+	+	+	+
10	537	Urin	±	+	.	.	.	.	—	+
11	539	Urin	±	+	.	.	.	.	—	+
12	553	Stuhl	+	+	+	—	—	+	+	+
13	614	Stuhl	+	+	+	+	+	+	+	+
14	722	Urin	+	+	—	—	—	—	+	+
15	734	Stuhl	+	+	+	+	(+)	+	+	+
16	735	Urin	—	—	+	+	+	+	+	+
17	795	Stuhl	+	—	+	—	(+)	+	+	+
									Paratyphus-B-Bazillen	
18	811	Stuhl	+	—	+	+	+	+	+	+
19	838	Stuhl	—	—	+	+	+	+	+	+
20	854	Urin	.	.	+	+	+	+	+	+
									Paratyphus-Breslau-Bazillen	
21	200	Stuhl	—	—	+	+	+	+	+	+
22	519	Stuhl	—	—	+	+	+	+	+	+
23	767	Stuhl	+	—	+	+	+	+	+	+
									Paratyphus-Gärtner-Bazillen	
24	828	Stuhl	—	—	+	+	+	+	+	+
									Pseudoruhr-Bazillen	
25	206	Stuhl	+	—	—	—	—	—	+	—
26	476	Stuhl	+	—	—	—	—	—	+	—
27	526	Stuhl	+	—	—	—	—	—	+	—

Von verdächtigen Kolonien werden Probeagglutinationen und Reihen angelegt, die in typischer Weise ausfallen. Auch auf Stärkebrillantgrünplatten agglutinieren die Kolonien ganz einwandfrei im Gegensatz zu den entsprechenden Agarbrillantgrünplatten (s. Nr. 3, 5, 15, 17). Sehr bemerkenswert sind 3 Fälle von Urin mit Typhusverdacht, bei denen die Agglutinationen von der Agarendoplatte negativ bzw. zweifelhaft ausfielen, während gleichzeitig die Agglutination von den parallelen Stärkeplatten eindeutig positiv war (s. Nr. 8, 10, 11). Wurde jetzt das Material auf Agar neu überimpft und bei 22° bebrütet, so war auch hier die Agglutination ganz einwandfrei vorhanden. Es handelte sich also um Stämme mit Vi-Antigen.

Es wurde beobachtet, daß das Wachstum auf Stärke- und auf Agarplatten in bezug auf die Zahl der aufgegangenen Kolonien im allgemeinen gleich ist. Manche apathogene Keime wachsen in so charakteristischen Kolonien, daß es, oft im Gegensatz zu Agarplatten, nicht nötig ist, bunte Reihen anzulegen.

Tabelle IV.
Schema von Kolonieformen auf Stärkeplatten.

Aufsicht	Art	Querschnitt
	Typhusbazillen	
	Paratyphusbazillen	
	Colibazillen	
	Paracolibazillen	
	Pyocyaneusbazillen	

Das ist vor allem bei Paracolibazillen der Fall, die auf Endostärke in farblosen, undurchsichtigen Kolonien mit hellem, glasigen Hof wachsen und sich so in geröteter Umgebung scharf abheben. Ebenso bei Pyozyaneusbazillen, die Kolonien mit zentralem Knopf, Graben und äußerem Wall bilden. Typhusbazillen wachsen teils in zarten, runden Kolonien, teils auch in einer äußerst charakteristischen Form wie verspritzte, wasserklare Tropfen, mit unregelmäßigen, gezackten Rändern. Paratyphusbazillen wachsen oft in einem ganz flachen Kegel, gelegentlich auch in Tropfen wie Typhusbazillen; Paratyphus-B-Bazillen bei Zimmertemperatur mit deutlichem Schleimwall. Die Kolonien der Colibazillen sind dagegen größer, gröber und undurchsichtiger. Die Diagnosestellung ist nach kurzer Einarbeitung in üblicher Weise möglich.

Besonders hat sich auf der Typhusstation wie schon bei Agar so auch bei Stärke die Brillantgrünplatte[1]) bewährt. Dabei wurde beobachtet, daß Heubazillen, die auf Brillantgrünplatten geimpft werden, völlig gehemmt werden. Die Folgerung, daß das Stärkemehl für die Herstellung von Brillantgrün- und Malachitgrünplatten nicht sterilisiert zu werden braucht, hat sich bewahrheitet.

Wir sind uns darüber klar, daß mit der Stärkeplatte nur ein Anfang gemacht worden ist, um einen brauchbaren Ersatz für ein ausländisches Erzeugnis einzuführen. Dieser Anfang gibt aber zu der Erwartung Anlaß, daß die Bemühungen um eine fortschreitende Verbesserung der Technik der Stärkeplatte einen festen Platz in jedem bakteriologischen Laboratorium sichern werden.

Anmerkung: Demonstriert werden Platten aus gehärteter Gelatine und beimpfte Platten aus Polyinylalkohol, Zellulose, Blutstärkeplatten, Kochblutstärkeplatten, Endostärkeplatten, Brillantgrünstärkeplatten, Malachitgrünstärkeplatten, Cholerastärkeplatten, Platten für Säurefeste und einfache Stärkeplatten und -Schrägröhrchen.

1) Nach Kauffmann, Z. Hyg. **117**, 26 (1936); **119**, 233 (1937), modifiziert von Schindler (Diss. Breslau 1939) auf pH 6,7—6,9.

Aussprache.

T. Wohlfeil (Berlin):

Auf der Seuchenabteilung des Instituts Robert Koch in Berlin sind die Untersuchungen über das Vorkommen und die Brauchbarkeit natürlicher Ersatzstoffe des Agars im deutschen Hoheitsgebiet fortgeführt und so weit zu einem Abschluß gekommen, daß darüber abschließend berichtet werden soll.

Ein gleichwertiger natürlicher Ersatz der ausländischen Algen (Eucheuma, Gelidium, Gigartina), aus denen in verschiedenen, meist sehr einfachen Fabrikationsprozessen der Agar hergestellt wird, gibt es weder in Mitteleuropa noch im besonderen in Deutschland. Daß aus Chondrus crispus (Carageen) ein durchaus brauchbarer klarer Nährboden herzustellen ist — Demonstration verschiedener Kulturen — wurde schon auf dem letzten Kongreß 1937 vermerkt. Chondrus crispus wird mit 0,3 Proz. Ammoniumoxalat in der Hitze gelöst, die wirksamen Peptinsubstanzen mit 98proz. Alkohl im Verhältnis 1:5 ausgefällt, getrocknet und in 3—5proz. Lösung in gleicher Weise wie Agar verwandt. Umfangreiche Untersuchungen mit Anionen und Kationenzusätzen haben ergeben, daß die Festigkeit der Carageennährböden nach Zusatz von Ammonsulfat, Kaliumammoniumtartrat und Kalium-Natriumtartrat bei ca. 1/30 Molarität, ferner nach Zusatz sämtlicher Zuckerarten erheblich steigt. Auch Spezialnährböden aller Art lassen sich damit anfertigen, auf denen auch empfindliche Mikroben wachsen. Da jedoch Carageen an den heimischen Küsten in zu geringer Menge vorkommt, läßt es sich als Nährbodengrundsubstanz praktisch nicht verwenden. Die Schleimsubstanzen von Lichen islandicus, Radix altheae, sowie der Süßwasseralge Spirogyra konnten in keiner Weise gelierfähig gemacht werden Von den Algen der Ost- und Nordsee erwiesen sich die sehr reichlich zur Verfügung stehenden Fucusarten (Blasentang) als unbrauchbar. Aus den Laminariaarten (Laminaria saccharina, L. digitata, L. hyperborea) konnte durch Kochen mit verdünnten Laugen und Alkoholfällung ein zusammengesetztes Pektin isoliert werden, welches jedoch nur zähflüssig zu lösen war und mit den oben genannten Anionen allein nicht gelierte. Jedoch ließ sich eine Gelierung erreichen, wenn der zähflüssige Laminariapektinbouillonnährboden mit einer 10proz. sterilen Kalziumchloridlösung überschichtet wurde. Die entstehende feste Gallerte konnte geschnitten und gewaschen weraen und ergab nach Sterilisation einen festen Nährboden, auf dem u. a. Staphylokokken und Colibazillen gut wuchsen. Das Vorkommen von Laminaria an deutschen Küsten ist jedoch gleichfalls begrenzt. Man wäre (nach entsprechenden Auskünften des Direktors der biologischen Reichsanstalt in Helgoland Herrn Prof. Dr. Hagemann) auf die nach Stürmen angeschwemmten Laminarien angewiesen, da eine Ernte der an den deutschen Felsenküsten wachsenden Laminariawälder wegen der ungünstigen Beeinflussung der Fischzucht nicht verantwortet werden könnte. Großversuche mit den Laminariapektinen ließen sich in der Folge nicht durchführen, da die einzige deutsche Pektinindustrie (Turongesellschaft m. b. H. Frankfurt a. M.) nach anfänglicher Bereitwilligkeit, anscheinend aus wirtschaftlichen Erwägungen, die Zusammenarbeit abgelehnt hat. Endlich soll an dieser Stelle Herrn Geheimrat Prof. Dr. Ficker, São Paulo, unser Dank ausgesprochen werden, der es ermöglichte, daß mir die älteren Aufzeichnungen des Herrn Geheimrat Hofmann über Agarersatzversuche zugänglich gemacht worden sind.

J. Wüstenberg (Gelsenkirchen):

Wegen wesentlicher Ersparnisse wird an vielen Instituten und Untersuchungsämtern ein Pepton verwendet, das in eigenen Betrieben hergestellt wird. Ein Liter Bouillon, aus eigenem Pepton hergestellt, kostet nur etwa 3,8 Pfennige, während die gleiche Menge Bouillon, mit Pepton von Brunnengräber hergestellt etwa 25 Pfennige und mit Pepton „Witte“ hergestellt sogar 40 Pfennige kosten würde.

Ich möchte heute auf Untersuchungen unseres Volontärassistenten Ehwe kurz verweisen. Er untersuchte 12 Peptonsorten, darunter neben den Peptonen der großen Firmen auch zwei von uns hergestellte Peptone, die aus Kälber- bzw. Schweinemägen gewonnen wurden. Die Ergebnisse waren überraschend. Manche der käuflichen Peptone zeigten völlig unzureichendes Wachstum, die eigenen und sehr billigen Peptone waren sogar verschiedenen Handelspeptonen überlegen. Am eindrucksvollsten waren die Untersuchungsergebnisse der Liquorproben, der Typhusstühle und der Abstriche auf Diphtheriebazillen. Ohne daß man von einem Zufallsbefund sprechen könnte, zeigten sich immer wieder Ausfälle bei bestimmten Peptonarten, während andere ein gleichmäßig gutes Wachstum aufwiesen.

Die Untersuchungen zeigten eindeutig, daß man nicht Pepton gleich Pepton setzen kann. Will man eine gleichmäßige kulturelle Ausbeute günstiger diagnostischer Ergebnisse erhalten, dann müssen wir zur Verwendung des besten käuflichen Peptons raten, und das sind bestimmte Peptonsorten von Witte sowie das Pepton von Merck.

9. A. Illényi und K. H. Büsing (Marburg):

Neue Züchtungsverfahren für Anaerobier unter Verwendung von l-Askorbinsäure und anderen reduzierenden Stoffen [1].

Mit 1 Abbildung im Text

Die ersten Versuche über die Züchtung von Anaerobiern in askorbinsäurehaltigen Nährböden wurden meines Wissens von O. Ehrismann im Jahre 1936 angestellt. Ich erhielt erst Kenntnis von dieser Arbeit, nachdem ich schon einen großen Teil meiner Untersuchungen abgeschlossen hatte. In völliger Unabhängigkeit von Ehrismanns Untersuchungen führten meine Versuche zu gleichsinnigen Ergebnissen.

Nachdem ich in einigen tastenden Vorversuchen gefunden hatte, daß eine gewöhnliche Nährbouillon ($p_H = 7,5$, 1 Proz. Pepton, 0,5 Proz. NaCl) durch Zusatz einer gewissen Menge l-Askorbinsäure einen ausgezeichneten Nährboden fur Anaerobier abgibt, ermittelte ich die fur das Anaerobenwachstum notwendige Mindestkonzentration an l-Askorbinsäure. Hierbei ergab sich, daß sämtliche von mir geprüften Anaerobenstämme (zum Teil Laboratoriumstsämme, zum Teil frisch aus Krankheitsmaterial gezuchtete Stämme) sich rasch und reichlich bei einer Askorbinsäurekonzentration von 1 : 10000 entwickeln. Die geprüften Anaerobenstämme: B. tetani, B. botulinus, B. perfringens, B. Novy, Rauschbrand- und Pararauschbrandbazillen verhielten sich bis zu dieser Konzentration vollkommen gleichartig. In den meisten Fällen gelingt es auch noch bis zu einer Verdunnung von 1 : 20000 die Anaerobier zur Entwicklung zu bringen. Allerdings trat hier eine sichtbare Vermehrung erst im Verlauf von 48 Stunden ein und die Kultur zeigte im übrigen auch weiterhin nur spärliches Wachstum. Nach meinen bisherigen Erfahrungen lassen sich die betreffenden Stämme in Askorbinsäurebouillon unbegrenzt weiterzüchten. — Selbstverständlich wurden laufend Kontrollen auf Reinheit der Kulturen durchgeführt und darauf geachtet, daß nur streng anaerobe Stämme zur Anwendung gelangten. — Das Wachstum der Keime in Askorbinsäurebouillon war dadurch ausgezeichnet, daß die Einzelindividuen morphologisch stets typisch und regelmäßig ausgebildet waren. Die Versporung, die übrigens auch regelmäßig bei B. perfringens eintrat, erfolgte bei allen Keimen im Verlauf von 48—72 Std. Untersuchungen über die Intensität der Toxinbildung bzw. über eine etwa entgiftende Wirkung der Askorbinsäure sind noch im Gange. Ein gewisser Nachteil der Askorbinsäurebouillon besteht darin, daß dieselbe möglichst frisch durch Zugabe von l-Askorbinsäure zu gewöhnlicher Bouillon bereitet werden muß. Die frisch hergestellte Askorbinsäurebouillon ist dann für etwa 4—5 Tage haltbar und verliert nach dieser Zeit die Eigenschaft, Anaerobier zur Entwicklung zu bringen.

---

1) Aus dem Hygienischen Institut der Universität Marburg-Lahn (Direktor: Prof. Dr. Pfannenstiel).

Die reduzierende Wirkung des Glutathions erwies sich in diesen Versuchen als weit geringer. Nur Konzentrationen von 1 : 100 bis 1 : 300 bewirkten ein Anaerobenwachstum. Vitamin B_1 ermöglichte kein Anaerobenwachstum in gewöhnlicher Bouillon.

Die von Herrn Illényi in früheren Untersuchungen festgestellte Tatsache, daß der hohe Sauerstoffverbrauch des B. prodigiosus auf der Bildung einer reduzierenden Substanz (wahrscheinlich l-Askorbinsäure) beruht, veranlaßte uns zu folgenden Versuchen:

Da jene als Askorbinsäure anzusehende Substanz vom B. prodigiosus in größter Menge in xylosehaltigen Nährböden gebildet wird, verwandten wir zur Gewinnung einer möglichst großen Askorbinsäuremenge ausschließlich diesen Zucker als Nährbodenzusatz. In geeigneten Versuchsanordnungen wurde dann angestrebt, das in solchen Prodigiosuskulturen gebildete Vitamin C in Lösung zu erhalten und diese zur Anaerobenzüchtung zu verwenden.

1. Versuch.

B. prodigiosus wurde auf 2proz. Xyloseagar in Kochschen Schalen 4 Tage lang bei 37° gezüchtet. Die Kultur wurde alsdann mit etwa 40 ccm physiol. Kochsalzlösung abgeschwemmt. Die trübe Lösung wurde eine Stunde lang zur Vorklärung bei 3500 Umdrehungen zentrifugiert und anschließend durch Seitzfilter keimfrei filtriert. Von dem klaren und keimfreien Filtrat wurden 5 ccm zu 8 ccm gewöhnlicher Bouillon gegeben und diese Mischung mit Tetanusbazillen geimpft. Bereits nach 24 Std. war deutliches Wachstum zu beobachten. Die Kulturen wurden täglich durch Objektträgerausstriche und im Dunkelfeld geprüft. Eine Versporung trat erst nach 3 Tagen ein; eine vollkommene Versporung erfolgte im Verlauf von 8 Tagen. — Derselbe Versuch wurde mehrfach mit B. botulinus und B. perfringens wiederholt. Auch bei diesen Keimen trat innerhalb derselben Zeit Wachstum und Versporung ein.

2. Versuch.

Obwohl aus der älteren Literatur mehrfach Versuchsergebnisse vorliegen, die das Anaerobenwachstum bei gleichzeitiger Züchtung von Aerobiern im gleichen Nährboden beschreiben, wurden diese Versuche mit Xylosebouillon wiederholt.

In mit Prodigiosus beimpfte Xylosebouillon wurden außerdem Tetanus- bzw. Gasbrandbazillen eingesät. Beide Anaerobier zeigten nach 24 Std. gutes Wachstum und nach 48 Std. beginnende Versporung.

Kedrowski, der bereits im Jahre 1895 ähnliche Beobachtungen bei der Symbiose von Anaerobiern und Aerobiern machte, erklärte diese Tatsache entgegen der vorherrschenden Meinung Pasteurs („Sauerstoffzehrung" der Aerobier) folgenderweise: Durch Bildung eines fermentartigen Stoffes aus dem Nährsubstrat durch den Aerobier wird den Anaerobiern das Wachstum ermöglicht. Wir dürfen heute wohl mit Recht die Vermutung aussprechen, daß es sich bei diesem hypothetisch angenommenen, „fermentartigen Stoff" Kedrowskis um nichts anderes als l-Askorbinsäure handelte. — Um nachzuweisen, daß die in Xylosebouillon gebildete reduzierende Substanz in gelöster Form in die Bouillon übergeht, wurde der folgende Versuch angestellt.

3. Versuch.

Etwa 50 ccm 2proz. Xylosebouillon wurde mit B. prodigiosus beimpft und 4 Tage lang bei 37° bebrütet. Die Kultur wurde durch Zentrifugieren vorgeklärt und durch Seitzfilter keimfrei filtriert. Zu 7 ccm des so erhaltenen Bouillonfiltrates wurden zur Aufbesserung des Nährsubstrates 3 ccm frische

Bouillon gefügt und mit verschiedenen Anaeroben (Tetanus, Gasbrand, Botulinus) beimpft. Erst nach 3 Tagen war Wachstum und beginnende Sporenbildung zu erkennen. Im Verlauf von 4—6 Tagen traten dann auch reife Sporen auf; nach 8 Tagen waren die Kulturen völlig versport.

4. Versuch.

Von der Voraussetzung ausgehend, daß die von B. prodigiosus gebildete reduzierende Substanz dialysierbar sei, wurde versucht, die Anaerobier durch eine Zellophanmembran vom B. prodigiosus getrennt aber in physikalisch-chemischem Kontakt zu züchten. Da die üblichen Dialysierapparate uns für diesen Zweck nicht geeignet erschienen, wurde nachstehender Apparat konstruiert (Abbildung). Das angefeuchtete Zellophan wurde mittels Gummiband an der unteren Oeffnung des Einsatzröhrchens befestigt und anschließend getrocknet. Letzteres geschah, um das Hinüberkriechen des Prodigiosus zu verhindern, da der durch das Gummiband hergestellte Abschluß nicht als keimdicht anzusehen war. Dadurch, daß die Zellophanhülle möglichst hoch gezogen wurde, verhinderten wir auch das Uebertreten der getrennt zu haltenden Flüssigkeiten. In das Kölbchen kamen 20—30 ccm 2proz. Xylosebouillon, welche mit B. prodigiosus beimpft wurde; in das mit Zellophan versehene Einsatzröhrchen fügten wir 5 ccm gewöhnliche Bouillon, die mit Anaerobiern beimpft wurde. Ein Wachstum der Anaerobier war unter diesen Umständen nur zu erwarten, wenn die in der Xylosebouillon vom B. prodigiosus gebildete reduzierende Substanz durch die Membran hindurchtrat.

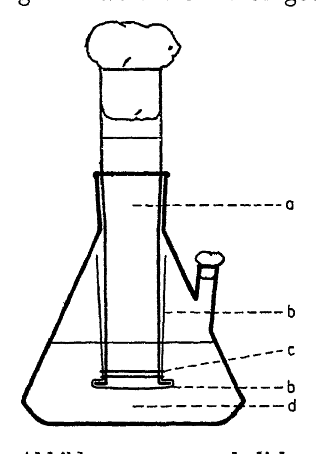


Abbildung. *a* = gewöhnliche Bouillon; *b* = Zellophanmembran; *c* = Gummiband; *d* = Xylosebouillon.

In dieser Versuchsanordnung gelang es uns stets, Tetanus-, Gasbrand- und Botulinusbazillen zum Wachstum zu bringen. Meist war schon nach 24 Std. deutliches Wachstum vorhanden; gelegentlich trat eine genügende Vermehrung jedoch erst nach 2—3 Tagen ein.

Der endgültige Nachweis, daß es sich bei der vom B. prodigiosus gebildeten reduzierenden Substanz um l-Askorbinsäure handelt, steht noch aus. Diesbezügliche Versuche sind noch im Gange.

Die hier dargelegten Ergebnisse sind vorläufig überwiegend von theoretischem Interesse. Es ist anzunehmen, daß die Rolle, welche die l-Askorbinsäure bei der Anaerobenzüchtung spielt, nicht nur in bakteriologischer Hinsicht bedeutungsvoll ist, sondern auch die Stellung des Vitamin C als allgemein biologisches, anaerobiotisches Prinzip hervorhebt. Von praktischem Interesse ist die Tatsache, daß es mit Hilfe der Askorbinsäurebouillon gelingt, auf einfache und schnelle Weise Anaerobier auch in Bakteriengemischen zur Entwicklung zu bringen.

Schrifttum.

1) Ehrismann, O., Z. Hyg. **118**, 544 (1936). — 2) Illényi, A., Biochem. Z. **295**, 117 (1937). — 3) Ders., u. Berencsi, G., Ebenda **297**, 46 (1938). — 4) Dies., Ebenda **298**, 299 (1938). — 5) Dies., Ebenda **298**, 301 (1938). — 6) Kedrowski, Z. Hyg. **20**, 358 (1895).

10. G. Blaurock (Berlin):

Bifiduszüchtung auf zystinhaltigen Nährböden [1]).

Mit 1 Abbildung im Text.

Der Darm des Menschen bietet in seinen unteren Abschnitten günstige Bedingungen für die Ansiedlung und Vermehrung von Bakterien und beherbergt infolgedessen eine üppige Bakterienflora, die im Dickdarm einen beträchtlichen Teil des gesamten Darminhaltes ausmacht. Die Frage nach der Bedeutung dieser Darmbakterien für den Wirtsorganismus hat seit den Anfängen der bakteriologischen Forschung zahlreiche Theoretiker und Kliniker beschäftigt. Ein Blick in das umfangreiche Schrifttum zeigt, welche Mühe an die Beantwortung dieser Frage gewendet worden ist —, zeigt aber auch, wie weit wir noch von ihrer Klärung entfernt sind.

Das Bestreben nach einer möglichst vollständigen Kenntnis aller im Darm ständig oder vorübergehend nachweisbaren Keimarten hat sich als verhältnismäßig wenig fruchtbar erwiesen. Aufschlußreicher war das Bemühen, unter den verschiedenen Darmbakterien jene ausfindig zu machen, die für die physiologischen Vorgänge im Darm und im Gesamtorganismus bedeutungsvoll erscheinen, und ihnen ein besonders gründliches Studium angedeihen zu lassen.

Unter den Darmbakterien nimmt das Bacterium bifidum eine auffällige Sonderstellung ein. Es stellt bei Menschen aller Altersklassen und Ernährungsformen einen wechselnd großen, aber stets vorhandenen Anteil der normalen Darmbewohner. Darüber hinaus bildet es beim Säugling annähernd die gesamte Darmflora, solange die Nahrung ausschließlich aus Frauenmilch besteht. Diese physiologische Bifidusflora im Säuglingsdarm, die ebenso lange andauert, wie die Ernährung des Säuglings auf die natürliche Weise mit arteigener Milch erfolgt, hat die Bifidusbakterien zum Gegenstand besonderen Interesses gemacht und zu zahlreichen Untersuchungen über ihre Natur und über die Gründe ihrer zeitweiligen Vorherrschaft Veranlassung gegeben.

Diese Forschungen erhielten einen starken Anreiz durch die klinische Erfahrung der Kinderärzte, daß die Bifidusflora als ein Zeichen für einen einwandfreien physiologischen Ablauf aller Vorgänge im Magen-Darmkanal gewertet werden kann.

Auch meldeten sich immer Stimmen, die den Bifidusbakterien und ihren Stoffwechselprodukten eine unmittelbare Bedeutung für ihren Wirt beimaßen und die das bessere Gedeihen und die größere Widerstandsfähigkeit, die das natürlich genährte Kind gegenüber dem künstlich ernährten Säugling aufweist, mit der Bifidusflora in einen ursächlichen Zusammenhang brachten. Diese wichtige Frage ist jedoch bis heute unbeantwortet geblieben, und zwar in erster Linie deshalb, weil die künstliche Züchtung der Bifidusbakterien bisher mit sehr beträchtlichen Schwierigkeiten verbunden war. Ich möchte deshalb

---

1) Aus der Kinderklinik der Universität Berlin und dem Institut Robert Koch, Berlin.

Ihre Aufmerksamkeit auf die Tatsache lenken, daß die Technik der Bifiduszüchtung neuerdings wesentliche Fortschritte gemacht hat, so daß es heute möglich scheint, das Bifidusproblem erneut und mit besserem Erfolg als bisher in Angriff zu nehmen. Die erzielten Fortschritte beruhen auf der 1936 von mir mitgeteilten Beobachtung, daß die schwefelhaltige Aminosäure Zystin eine ausgesprochen fördernde Wirkung auf die Entwicklung der Bifidusbakterien besitzt. Aus dieser Feststellung ließen sich praktische Nutzanwendungen für die Bifiduskultur ziehen.

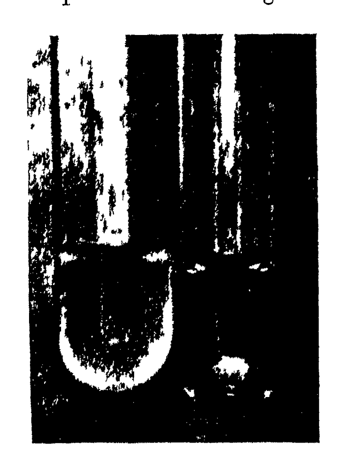
Zunächst konnte ich ein einfaches Plattenkulturverfahren für die Reinzüchtung des Bifidus ausarbeiten. Die Mehrzahl der zur Zeit bekannten Verfahren beruht auf dem Prinzip, durch Vorkulturen in geeigneten flüssigen Nährböden den Bifidus anzureichern und das Wachstum der übrigen Stuhlbakterien zu hemmen. Die Vorkulturen werden dann in verschiedenen Verdünnungen verimpft in feste Nährböden, aus denen sich schließlich durch Abstechen von Einzelkolonien Reinkulturen gewinnen lassen. Dieses Verfahren ist mühsam und hat den großen Nachteil, daß es in der Regel erst nach längerer Zeit zum Erfolg führt. Die Plattenoberflächenkultur ist einfacher, übersichtlicher und hinsichtlich der Gewinnung, Fortzüchtung und Reinhaltung der Kulturen zuverlässiger als das Arbeiten mit flüssigen Nährböden. Die bisherigen Versuche, die Plattenkultur in die Bifidusforschung einzuführen, haben sich jedoch nicht durchsetzen können, da die angegebenen Nährböden in ihrer Wirkung entweder unzuverlässig oder aus anderen Gründen ungeeignet waren. Einige Autoren haben sogar die Möglichkeit bestritten, den Bifidus zum Oberflächenwachstum zu bringen. Bei Benutzung zystinhaltiger Nährböden fallen diese Schwierigkeiten fort. Auf Agarplatten mit einem Zusatz von 1—2 Proz. Milchzucker und 0,1 pro Mille Zystin bildet der Bifidus in 12—24 Std. Oberflächenkolonien, so daß man auf solchen Nährböden aus Frauenmilchstühlen durchschnittlich in 2 Tagen Bifidusreinkulturen gewinnen und in üppig wachsenden Subkulturen weiterzüchten kann. Die Leistungsfähigkeit der Milchzucker-Zystin-Agarplatte läßt sich noch weiter steigern, wenn man zur Bereitung des Agars Leberbrühe verwendet. Zur Sauerstoffzehrung genügt das Prodigiosusverfahren. Ueber die Frage der Anaerobiose des Bifidus ist viel gestritten worden. Ich konnte ein aerobes Wachstum nur ausnahmsweise an lange fortgezüchteten, alten degenerierten Kulturen beobachten. Frische Oberflächenkulturen auf zystinhaltigen Milchzuckeragarplatten sind immer empfindlich gegen den Sauerstoffgehalt der atmosphärischen Luft, meist sogar sehr stark. Allerdings ist der Bifidus, wie so viele Anaërobier, nicht auf völlige Abwesenheit von Sauerstoff angewiesen. Er bedarf lediglich einer Verminderung der atmosphärischen Sauerstoffspannung. In reiner Wasserstoffatmosphäre gedeiht er bemerkenswerterweise nicht. Hierdurch erklären sich die Mißerfolge der Autoren, die zur Erzielung der Anaerobiose die Luft durch Wasserstoff verdrängten.

Es ist behauptet worden, daß die Bifidusbakterien saure Nährböden bevorzugen und sich den für ihr Wachstum günstigsten Säuregrad selbst erzeugen. Nach meinen Erfahrungen sind für Züchtungszwecke neutrale Nährböden überlegen. Der Bifidus ist zwar relativ widerstandsfähig gegen Säuregrade, aber er ist nicht azidophil.

Auch die flüssigen Bifidusnährböden konnten erheblich vereinfacht und verbessert werden. In milchzuckerhaltigem Peptonwasser, in dem der Bifidus an sich kaum gedeiht, erhält man durch Zusatz von 0,1 pro Mille Zystin in 12—24 Std. ein üppiges Wachstum. Zur Herabsetzung des Sauerstoffdruckes genügt Abfüllung in Langhalskölbchen und Aufkochen vor der Beimpfung.

Für experimentelle Studien bewährte sich mir folgendes Verfahren: Die Nährflüssigkeit wird in Mengen von 2 ccm in schmale Reagenzgläser eingefüllt, die nach der Beimpfung mit locker sitzenden Zellstoffpfropfen verschlossen werden. Dann werden Normalreagenzgläser, deren Weite zur Aufnahme der beimpften Rohrchen eben ausreicht, zunächst mit Pyrogallol, dann mit Pottasche beschickt. Hierauf folgt eine mäßig angefeuchtete Zellstoffkugel, die zur Einleitung des Sauerstoffabsorptionsprozesses und gleichzeitig zur Aufnahme der hierbei sich bildenden Flüssigkeit und zur Unterlage fur das Nährbodenrohrchen dient. Man kann in dieser Weise eine großere Anzahl Außengläser vorbereiten, da die Sauerstoffzehrung erst nach einer Weile einzusetzen pflegt. Nach Einfuhrung des beimpften Innenrohrchens wird das Außenrohrchen luftdicht verschlossen.

Die Oberflächenkultur auf der Milchzucker-Zystin-Agarplatte bietet die Moglichkeit, die Mengenverhältnisse der lebenden Bakterien in der Stuhlflora zu beurteilen und die bisherige vorwiegend bakterioskopische Beurteilung des Säuglingstuhls durch laufende kulturelle Untersuchungen zu ergänzen. Für experimentelle Zwecke hat sie den Vorzug, daß sie junge, täglich uberimpfbare Kulturen liefert. Damit ist die Gefahr ausgeschaltet, an uberalterten Kulturen praktisch bedeutungslose Sonderbefunde zu erheben. Auch können die erforderlichen Prüfungen ohne Schwierigkeiten an genügend zahlreichen, verschiedenen Bifidusstämmen durchgeführt werden. Die Züchtbarkeit in zystinhaltigem Milchzucker-Peptonwasser ermöglicht es, in wasserklaren Flüssigkeiten genau bekannter und einfacher Zusammensetzung den Verwendungsstoffwechsel zu studieren und über die Einwirkung zugesetzter Nährstoffe sichere Aussagen zu machen. Auch lassen sich im Bedarfsfall größere Mengen *Bifidusmaterial* z. B. für Vitaminstudien usf. gewinnen.


Abb. 1.

Nebenstehende Abbildung läßt die bifidusfördernde Wirkung des Zystins im flüssigen Medium erkennen. Das rechte Röhrchen enthält Peptonwasser mit einem Zusatz von 1 Proz. Milchzucker, das linke Rohrchen außerdem 0,1 pro Mille Zystin. Beide wurden gleichmäßig beimpft mit einem glattwachsenden Bifidusstamm. Nach 24stünd. Bebrütung zeigt das anfangs wasserklare zystinhaltige Rohrchen eine dichte Trübung, während in der zystinfreien Nährflüssigkeit kein Wachstum eingetreten ist.

In der Oberflächenkultur zeigt sich, daß es verschiedene *Bifidustypen* gibt. Die Wuchsform läßt zwei Arten deutlich voneinander unterscheiden. Die Mehrzahl der Bifidusstämme wächst auf der Plattenoberfläche (besonders bei Eiweißgegenwart) in glatten Kolonien, bildet einen saftig glänzenden Rasen und bewirkt in flüssigen Nährböden eine gleichmäßige Trübung (S-Typ). Andere Stämme bilden auf der Platte rauhe Kolonien, ihr Wachstumsrasen zeigt eine stumpfe Oberfläche, und in flüssigen Nährböden entsteht ein krümeliger Bodensatz (R-Typ). Rauh wachsende Stämme finden sich weniger häufig als glattwachsende. Bei diesen Typen handelt es sich nicht nur um Unterschiede in der Wuchsform, sie lassen sich auch serologisch streng voneinander trennen. Glattwachsende Stämme liefern bei der Kaninchenimmunisierung Seren, die lediglich die glatten Bifidusstämme agglutinieren. Rauh wachsende

Stämme liefern agglutinierende Seren, deren Wirksamkeit ausschließlich auf rauhwachsende Stämme beschränkt ist. Die angeführte Tabelle zeigt diese typenspezifische Agglutination. Sie enthält das Ergebnis, das an 65 fortlaufend frisch gezüchteten Stämmen gewonnen wurde (Stamm-Nr. 11—75).

Typenspezifische Agglutination der Bifidusstamme

Laufende Stamm-Nr.	Wuchsform	Gruppenspezifisches Anti-S-Serum von S-Stamm Nr.			Gruppenspezifisches Anti-R-Serum von R-Stamm Nr.		
		15	24	25	19	20	34
12	S	6400	1600	1600	0—100	0—100	0—100
13	S	800	800	800	0—100	0—100	0—100
15	S	1600	800	800	0—100	0—100	0—100
22	S	800	6400	800	0—100	0—100	0—100
24	S	12800	12800	880	0—100	0—100	0—100
25	S	800	1600	800	0—100	0—100	0—100
26	S	3200	1600	800	0—100	0—100	0—100
33	S	1600	800	800	0—100	0—100	0—100
35	S	800	1600	1600	0—100	0—100	0—100
41	S	800	800	800	0—100	0—100	0—100
50	S	25600	25600	1600	0—100	0—100	0—100
55	S	800	3200	800	0—100	0—100	0—100
75	S	800	.	800	0—100	0—100	0—100
11	R	0—100	0—100	0—100	800	1600	800
19	R	0—100	0—100	0—100	800	800	1600
20	R	0—100	0—100	0—100	1600	800	3200
34	R	0—100	0—100	0—100	6400	1600	1600
38	R	0—100	0—100	0—100	1600	1600	800
54	R	0—100	0—100	0—100	12800	6400	12800
61	R	0—100	0—100	0—100	12800	6400	1600
63	R	0—100	0—100	0—100	3200	6400	12800
73	R?	0—100	0—100	0—100	3200	800	800

Man sieht, daß die jeweils von einem einzelnen S- bzw. R-Stamm gewonnenen Seren gegenüber der entsprechenden Wuchsform einen Titer bis zu 25600, mindestens aber von 800 besitzen (Ablesung mit bloßem Auge). Die nicht entsprechende Wuchfsorm wird dagegen nicht oder nur bis zum Titer 100 agglutiniert, der als unspezifisch angesehen werden darf. Die Zusammenstellung zeigt ferner, daß etwa $^2/_3$ der Stämme von den zur Prüfung verwendeten Seren nicht erfaßt wurden; alle in der Tabelle nicht angeführten Stamm-Nr. der laufenden Reihe 11—75 wurden weder von den 3 Anti-S-Seren noch von den 3 Anti-R-Seren agglutiniert. Innerhalb dieser Gruppe finden sich wiederum serologisch verschiedenartige Bifidusstämme: Stämme, die bei der Kaninchenimmunisierung Seren liefern, die ausschließlich den zur Immunisierung verwendeten Stamm selbst agglutinieren und Stämme, die am Kaninchen überhaupt keine agglutinogene Wirkung entfalten.

In der Oberflächenkultur erweist es sich ferner, daß die viel erörterte Umzüchtbarkeit des Bifidus in Azidophilus nicht zutrifft, sondern daß die Anschauung derjenigen Autoren zu Recht besteht, die zwischen Azidophilus und Bifidus streng unterschieden haben. Der Bifidus hat keinerlei Neigung zur Symbiose mit Azidophilus, und ist von diesem kulturell und serologisch völlig verschieden. Bei der Aussaat eines normalen Frauenmilchstuhles auf die Zystin-Milchzucker-Agarplatte erhält man fast ausschließlich Bifiduskolonien. Beifütterung künstlicher Nahrung und Störungen des Gesundheitszustandes der Säuglinge führen sofort zum gehäuften Auftreten von Colikolonien und Kokkenkolonien. Der Azidophilus tritt normalerweise an Häufigkeit gegenüber

dem Bifidus völlig zurück. Die grampositive Bruststuhlflora wird also mit vollem Recht als Bifidusflora bezeichnet.

Die nähere Beschäftigung mit den Bifidusbakterien zeigt, daß die einzelnen Bifidusstämme kulturelle und morphologische Verschiedenheiten aufweisen, teils gebunden an die Typen, teils als individuelle Stammeseigentümlichkeiten. Es finden sich Unterschiede in den mikroskopischen Formen, in der Vermehrungsfähigkeit, in der Wachstumsgeschwindigkeit, im Verwendungsstoffwechsel, in der Kohlehydratverwertung, im Verhalten gegenüber Eiweiß. Die verbesserte Technik der Bifiduszüchtung gestattet es, diese Verhältnisse eingehend zu studieren. Darüber hinaus aber läßt sie eine erneute Inangriffnahme der klinischen Seite des Bifidusproblems heute aussichtsreicher erscheinen, als es früher der Fall war.

11. A. St. v. Mallinckrodt-Haupt (Köln):

Oberflächen- und Tiefenwachstum in der Kultur[1]).

Die ursprüngliche Fragestellung, die zu den vorliegenden Untersuchungen geführt hat, war keine bakteriologische. Sie stand in Zusammenhang mit dem Problem der krebsigen Zellentartung. Die Umwandlung der Basalzelle der menschlichen Haut zur Krebszelle führt bekanntlich — abgesehen von der ungeordneten Zellteilung und hemmungslosen Vermehrung — zu Störungen im Eiweißstoffwechsel, die sich rein morphologisch in einer unvollständigen Verhornung zeigen, zu einer Umstellung des Atmungstypus von der Sauerstoffatmung zur Gärung und schließlich — wahrscheinlich im Zusammenhang damit — zu einer Richtungsänderung im Wachstum: die Basalzelle, die normalerweise mit fortschreitender Verhornung nach außen rückt und schließlich abgestoßen wird, durchbricht als Krebszelle die Epidermis-Bindegewebsgrenze und wuchert in die Tiefe. Sie verhält sich also, um einen groben Vergleich zu gebrauchen, plötzlich wie ein Anaerobier in der Kultur.

Bevor wir nun daran gingen, in dem komplizierten Gewebsverband nach Faktoren zu suchen, die an dieser Aenderung der Wachstumsrichtung beteiligt sind, schien es zweckmäßiger, zunächst unter den relativ einfachen Verhältnissen an einzelligen Mikroorganismen in der Kultur nach Gründen zu suchen, die eine Aenderung des Oberflächen- oder Tiefenwachstums hervorgerufen.

Untersucht wurde

1. der Einfluß von Eiweißabbauprodukten.
2. der Einfluß von Kohlehydraten.
3. der Einfluß von Vitaminen und ihren Vorstufen.
4. die Bedeutung der aktuellen Reaktion des Milieus.

Eine exakte Messung der Atmungsänderung und -größe wurde noch nicht vorgenommen, es wurde vorläufig vorausgesetzt, daß Oberflächenwachstum mit stärkerem Sauerstoffbedürfnis, Tiefenwachstum mit vermindertem bzw. mehr anaerober Atmungsweise gleichzusetzen ist. Für die Berechtigung dieser Auffassung spricht, außer der allgemeinen Erfahrung, eine neuere Arbeit von Nord. Er konnte durch Ein-

1) Aus der Universitäts-Hautklinik in Köln (Direktor: Prof. Dr Bering).

griffe in den Phosphorstoffwechsel in Fusariumkulturen eine Umstellung von der alkoholischen Garung zur Sauerstoffatmung willkürlich erzwingen. Gleichzeitig änderte sich das morphologische Wachstum: der Pilzrasen, der bisher aus einer vollständig benetzten Decke innerhalb der Nährlosung bestand, bildete nunmehr — bei Sauerstoffatmung — ein Myzel, dessen Fäden auf der Oberflache wachsend, in die Luft hineinragten, nicht benetzbar waren und die Aufnahme des Sauerstoffs aus der Luft vermittelten.

Zunächst die Versuchsanordnung. Um erst einmal einen allgemeinen Ueberblick zu bekommen, wurden großere Reihenversuche mit den verschiedensten Mikroorganismenarten unter Variation des Nährmediums angestellt. Um unter moglichst klaren Bedingungen zu arbeiten, fanden nur flussige, möglichst einfache Nahrlosungen aus chemisch bekannten Substanzen Verwendung. Die Nährlosungen bestanden aus Aminosäuren als Stickstoffquelle unter Zusatz der verschiedensten Zucker und einer Mischung mineralischer Salze, darunter auch anorganischem Phosphor.

Die untersuchten Mikroorganismen ließen sich nach ihrem Verhalten in der Kultur in 2 Gruppen teilen:

1. solche, die in den ublichen Nährlösungen weder ausgesprochenes Oberflachen- noch Tiefenwachstum zeigten, sondern in der Losung suspendiert wachsen und zu mehr oder minder starker Trübung fuhren: Subtilis (1 Stamm), Pyocyaneus (2 Stämme), Prodigiosus (1 Stamm), Coli (2 Stämme). Proteus und Faecalis alcaligenes zeigten in den verwendeten Nahrlösungen so unregelmäßiges Wachstum, daß sie nicht zum Vergleich herangezogen werden konnten. Offenbar sind sie bezüglich ihres Nahrsubstrates anspruchsvoller als die übrigen.

2. solche Mikroorganismen, welche für gewöhnlich ausgesprochenes Oberflächen- oder Tiefenwachstum zeigen, ohne zu den strikten Anaerobiern zu gehören, und welche die Nährlosung vollig klar lassen, was für eine genaue Beobachtung besonders vorteilhaft ist. Hierher gehören Staphylokokken, Hefen, Aktinomyzeten und pathogene Hautpilze.

Von ihnen zeigten die Staphylokokkenstämme (albus und aureus), ebenso die Hefen (Oidium asteroides, Cryptococcus pararoseus) reines Tiefenwachstum.

Als besonders geeignet erschienen Aktinomyzeten, weil wir hier nach der Einteilung von Orskow und Jensen über 2 Gruppen verfügen, die ihre weitgehenden biologischen Unterschiede bereits morphologisch erkennen lassen: die langfädigen, sporenlosen Arten zeigen Oberflächenwachstum und Luftmyzelbildung, die anderen Tiefenwachstum in Kokken- oder Stäbchenform, ohne jede Bildung von Luftmyzel. Sie unterscheiden sich außerdem in der Fähigkeit der Nitratreduktion (Lieske), in der Porphyrinbildung und vielem anderen. Untersucht wurden 2 langfädige Stämme (Actinomyces virido-chromogenes, Actinomyces coelicolor) und ein in der Tiefe wachsender (Actinomyces lutea Karthum).

Aehnlich liegen die Dinge bei den pathogenen Hautpilzen: die meisten von ihnen — Kaufmann-Wolf-Pilz, Trichophyton gypseum, Mikrosporon Audouini, Epidermophyton inguinale, Achorion Quickeanum — zeigen ausgesprochenes Oberflächenwachstum mit dichtem, nicht benetzbarem Luftmycel. Nur Achorion Schönleini zeigt überwiegend Tiefenwachstum und ist nicht imstande, Luftmycel zu bilden.

Nun zu den Resultaten. Soweit die Versuche bisher abgeschlossen sind, kann man folgendes sagen: wie zu erwarten, verhielten sich die einzelnen untersuchten Keime verschieden, was bei den Unterschieden in ihrem spezifi-

schen Stoffwechsel nicht wundernimmt. So waren z. B. die Pyozyaneusstämme unter den gegebenen Bedingungen nicht zu beeinflussen, während Coli oder die Aktinomyzeten relativ starke Differenzen zeigten. Trotzdem ergeben sich im ganzen gesehen bereits folgende Richtlinien:

1. Von ausschlaggebender Bedeutung scheint die Stickstoffquelle zu sein. Von den verwendeten Aminosäuren ließ nur Harnstoff keine besondere Wirkung erkennen, Asparagin hatte eine ausgesprochene Oberflächenwirkung, und zwar gleichgültig, ob es gleichzeitig als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle, oder in Verbindung mit Zuckerarten gebraucht wurde. In den meisten Kulturen wurde starkes Oberflächenwachstum mit Häutchenbildung beobachtet. Dagegen riefen Zystin und Leuzin eine ausgesprochene Tendenz zum Tiefenwachstum hervor. Eine ähnliche Tiefenwirkung auf pathogene Hautpilze fand Williams in festen Zystinnährboden. Durch Zusatz von Methylenblau konnte er feststellen, daß wahrscheinlich oxydo-reduktive Vorgänge dabei eine Rolle spielen. Auch für eine Reihe anderer Aminosäuren steht fest, daß sie die Fähigkeit haben, als Bio-Indikatoren zu wirken, und zwar teils als H-Donatoren, teils als Akzeptoren (Richards, Stickland, Woods u. a.). Wir dürfen also wohl den Eingriff in oxydo-reduktive Prozesse als gemeinsame Basis ihres Wirkungsmechanismus annehmen. Wie weit außerdem noch bei den einzelnen Bakterien und Pilzen eine Anregung bzw. Hemmung der Fermentbildung (Dehydrasen) durch Aminosäuren in Frage kommt, bedarf noch der weiteren Klärung.

2. Was die Kohlehydrate anbelangt, so scheinen sie von geringerem Einfluß zu sein. Glukose und Maltose wirkten in manchen Fällen fordernd auf das Oberflächenwachstum. Die übrigen Zuckerarten — Lävulose, Fruktose, Laktose, Saccharose, Galaktose, Amylum, Glykogen und Mannit — ließen keinen sicheren Einfluß erkennen. Auffallend war aber z. B. bei den Colistämmen, daß nur in solchen Kulturen starkes Oberflächenwachstum mit Häutchenbildung auftrat, in denen keine Vergärung der dargebotenen Zuckerart stattfand. Wahrscheinlich ist nicht so sehr die dargebotene Zuckerart von Wichtigkeit als vielmehr die Art der entstehenden Abbauprodukte. Für Milchsäure (als Natriumsalz) konnte Williams zeigen, daß sie nach Zusatz zur Kultur bei Pilzen Tiefenwachstum in Oberflächenwachstum verwandelt.

3. Unter den Vitaminen war Vitamin B_1 von stärkstem Einfluß, es zeigte eine ausgesprochen begünstigende Wirkung auf Oberflächenwachstum und Häutchenbildung. In der gleichen Richtung, wenn auch in geringerem Grade, wirkte vielfach Vitamin C, während die übrigen — Vitamin A, Vitamin D und auch Laktoflavin — kein einheitliches Verhalten erkennen ließen. Auch hier kann man als gemeinsamen Faktor die Beeinflussung oxydo-reduktiver Prozesse annehmen. Für die fehlende Wirkung des Laktoflavin bleibt nach den bereits erwähnten Versuchen von Nord die Möglichkeit offen, daß es in Gegenwart von anorganischem Phosphor seine Wirkung nicht entfalten kann. Vielleicht kommen aber auch fur gewisse Mikroorganismen andere Fermentsysteme in Frage, wie z.B. für Staphylococcus aureus und albus nachgewiesen ist (Guha und Das).

4. Keinerlei Zusammenhänge bestanden anscheinend zwischen Wachstumsrichtung und aktueller Reaktion des Milieus. Die Wasserstoffionenkonzentration der verschiedenen Nährlösungen schwankte vor Beginn und nach Abschluß des Wachstums zwischen p_H 4,5 und 9,5. Eine Begünstigung des anaeroben Wachstums durch alkalische Reaktion, wie sie von mancher

Seite behauptet wird, konnte unter den vorliegenden Versuchsbedingungen nicht festgestellt werden. Es ist allerdings zu bedenken, daß die untersuchten Bakterien und Pilze eine sehr unterschiedliche Säure -und Alkaliempfindlichkeit besitzen, so daß hier noch eingehendere Untersuchungen, nach Gruppen getrennt, am Platze sind.

Die vorliegenden Untersuchungen werden ja überhaupt als Vorversuche gewertet und sollen nur die Richtungen anzeigen, in denen ein systematischer Ausbau erfolgen soll. Die Versuche sollen ausgedehnt werden auf das Verhalten weiterer Aminosäuren, auf exakte Messung der Atmungsform und -größe, und vor allem sollen sie in Zusammenhang gebracht werden mit dem spezifischen Stickstoff- und Kohlenstoffwechsel der verschiedenen Mikroorganismen. Außerdem ist noch der Zusatz bekannter, karzinogen wirkender Substanzen zur Kultur geplant.

Immerhin läßt sich bereits erkennen, daß Zusammenhänge bestehen zwischen Wachstumsrichtung, Atmungstypus und Art der vorhandenen Aminosäuren und daß eine Beeinflussung durch bestimmte Vitamine möglich ist. Vielleicht gelingt es auf diesem Wege, allgemeingültige Bedingungen zu finden, die Atmungstypus und Wachstumsrichtung regulieren und die auch auf die komplizierteren Zellverbände des Warmblüterorganismus Anwendung finden können.

Aussprache.

Pels Leusden (Kiel):

Wer öfter Gelegenheit hat, bzw. gezwungen ist, Bakterien aus der Gruppe der pathogenen anaeroben Bazillen zu identifizieren, wird wie wir schon häufiger die Erfahrung gemacht haben, daß diese Anaerobier in flüssigen Differenzialnährmedien, die man zur Prüfung der biologischen Leistungen beimpft hat, nicht wachsen. Man muß diese Feststellung leider auch machen, wenn die Nährmedien vor der Beimpfung keine Farbstoffzusätze irgendwelcher Art enthalten haben. Infolge dieses Versagens macht es Schwierigkeiten, die betreffenden Bakterien einwandfrei zu diagnostizieren.

Bei solchen vergeblichen Versuchen ist mir vor längerer Zeit aufgefallen, daß das Wachstum der pathogenen Anaerobier in gelatinehaltigen Nährmedien sehr viel besser ist als in gelatinefreien. Als ich dieser Beobachtung weiter nachging, zeigte sich folgendes: Setzt man zu den flüssigen Differenzialnährmedien etwa zu gleichen Teilen Gelatine zu, so wird das Wachstum anspruchsvoller Anaerobier dadurch außerordentlich gefördert. Beimpft man solche Nährmedien nur mit der genügenden Menge des zu diagnostizierenden Stammes, was allgemein zu empfehlen ist, so hat man jetzt keine Schwierigkeiten mehr, die Anaerobier zu kultivieren. Natürlich müssen die Kulturen wie üblich anaerob bebrütet werden. Nach unseren bisherigen Versuchen beeinflußt die Gelatine in keiner Weise das Vergärungsvermögen der in Frage kommenden Keime. Wir haben gleichzeitig den Vorteil, die Gelatineverflüssigung zu prüfen, ohne ein besonderes Gelatineröhrchen beimpfen zu müssen. Die Anaerobier wachsen rasch und üppig, sie sind in der Form absolut typisch.

In späteren Versuchen haben wir den Gelatinegehalt auf 10 Proz. erhöht. An den Prozentgehalt der chemisch zu verwertenden Substanzen (Kohlehydrate — Alkohole) wurde gegenüber den Angaben von Zeißler nichts geändert. Sterilisierte Lackmustinktur haben wir erst nach der Bebrütung zur Feststellung der p_H-Veränderungen hinzugefügt. Der Farbstoff kann sonst leicht bei der Bebrütung Veränderungen erleiden, die eine Beurteilung der chemisch-biologischen Leistungen des geprüften Stammes erschweren.

Uebrigens haben wir durch Zusatz von Zystein zum Nährboden eine erhebliche Wachstumsverbesserung erzielen können, nur ist das Präparat sehr teuer.

O. Hettche (München):

1. K. H. Büsing (Züchtungsverfahren für Anaerobier).

Bei den gemeinsam mit Münch durchgeführten Untersuchungen mit Kieselsäurenährböden konnten wir eine fördernde Wirkung von Natriumsulfit auf Koloniezahl und Koloniegröße beobachten, wenn den Wasserzählplatten 0,05 Proz. Na_2SO_3 zugesetzt wird. Wir

prüften daraufhin auch flüssige Nährböden mit Sulfitzusatz auf Verwendbarkeit zur Anaerobenzüchtung. In einer 1 Proz. Zenovis-Hefe-Extrakt enthaltenden Nährbrühe wuchsen auch anspruchsvolle Anaerobier schnell und üppig. Ein Vorteil des Sulfitzusatzes gegenüber Askorbinsäure ist die größere Haltbarkeit gegenüber Luftsauerstoff. Auch die Sulfitbrühen ergeben ein Wachstum der Anaerobier in ausgesprochen typischer Form, so wie es Büsing für Askorbinsäurebrühen beschreibt. Geprüft wurde Tetanus, Botulinus, Pararauschbrand u. a. Die Leistung von Tarozzibrühe kann durch Sulfit verbessert werden.

2. Blaurock (Züchtung von Bact. bifidum).

Der von Blaurock angegebene Nährboden hat sich in der Praxis bewährt. Das Wachstum auf ihm ist so gut, daß die Diagnose oft schon nach 24 Std. makroskopisch möglich ist. Die Stäbchen zeigen typische Verzweigungen und die Polkörnchen sind gut entwickelt.

Die Bedeutung der Bifidusflora für die Gesunderhaltung des Säuglings wird erst in den nächsten Jahren erkannt werden. Wird ein Säugling mit Kuhmilch ernährt, so verschwindet die Bifidusflora in dem Maße, wie Coliflora auftritt. Die Versuche der Münchener Kinderklinik (Malyoth und Kirimlidis), durch gewisse Zusatznahrung die Bifidusflora zu erhalten, haben inzwischen zu einem vollen Erfolg geführt. In Zukunft wird sich daher der Bakteriologe mehr mit der Züchtung von Bact. bifidum zu beschäftigen haben.

Blaurock (Berlin): Schlußwort.

12. Alfred Pettersson (Stockholm):

Ueber die Immunität gegen die negativ chemotaktische (negataktische) Substanz der Bakterien.

Die Mikroben bilden Stoffe, die auf bewegliche Tierzellen in zweierlei Weise einwirken, teils anlockend (positiv chemotaktisch), teils abstoßend (negativ chemotaktisch). Wenn die antibakterielle Immunität des Tierkörpers von der bakteriziden Wirkung der beweglichen Zellen, vor allem der polymorphkernigen Leukozyten, abhängt, wie z. B. betreffs des B. anthracis, B. histolyticus, Staphylokokkus und Streptococcus pyogenes und Pneumokokkus, so spielen natürlich diese beiden Stoffe dafür eine bedeutende Rolle. Es ist ja klar, daß sich ein, gegen die Leukozyten empfindlicher, Krankheitserreger nur dann im Tierkörper entwickeln kann, wenn er vor der Einwirkung der Leukozyten geschützt ist, speziell wenn diese Zellen durch die negataktische Substanz der Mikroben ferngehalten werden. Die Virulenz wird dadurch bedingt. Andererseits ist auch einleuchtend, daß die Unempfindlichkeit der Leukozyten einer Tierart gegen die negataktische Substanz eines Bakteriums diesem Tier eine Resistenz gegen diese verleihen kann.

Die Infektion mit virulenten Milzbrandbazillen und pyogenen Staphylokokken ist durch die Bildung eines von polymorphkernigen Leukozyten freien Oedems charakterisiert. Durch die Pneumokokken wird anfangs auch ein seröses Exsudat hervorgerufen. Die Infektion mit den zwei ersteren Krankheitserregern kann durch Zuführen von Leukozyten in verschiedener Weise angehalten werden. Schon vor langer Zeit wurde beobachtet, daß bei der Einführung gewisser, die Leukozyten stark anlockender Mikroben oder Stoffe zusammen mit den Milzbrandbazillen, die Infektion ausblieb. Von mir wurde sodann festgestellt, daß die Zugabe genügend großer Mengen arteigener Leukozyten zu den zu injizierenden Mikroben die Infektion mit Milzbrandbazillen und pyogenen Staphylokokken aufhob. Dies geht aus den folgenden Tabellen I, II, III und IV deutlich hervor. Von Insulander wurde in meinem Institut dasselbe betreffs Bac. histolyticus nachgewiesen.

Tabelle I.
Kaninchen mit normalen Kaninchenleukozyten und Milzbrandbazillen subkutan injiziert.

Infektionsdosis	Versuchstiere			Kontrolltiere	
	Menge der Leukozyten	Gewicht	Ausgang	Gewicht	Ausgang
1/5000 Oese	1,0 g	1440 g	lebt	1540 g	† nach 3 Tagen
1/2500 ,,	1,8 ,,	1460 ,,	,,	1470 ,,	† ,, 3 ,,
1/1200 ,,	2,5 ,,	1400 ,,	,,	1400 ,,	† ,, 3 ,,
1/640 ,,	2,2 ,,	1360 ,,	,,	1490 ,,	† ,, 3 ,,
1/320 ,,	2,2 ,,	1450 ,,	,,	1460 ,,	† ,, 2 ,,
1/250 ,,	2,0 ,,	1450 ,,	,,	1520 ,,	† ,, 3 ,,
1/160 ,,	2,0 ,,	1330 ,,	,,	1330 ,,	† ,, 2 ,,
1/120 ,,	2,5 ,,	1570 ,,	,,	1570 ,,	† ,, 2 ,,
1/80 ,,	3,0 ,,	1640 ,,	,,	1640 ,,	† ,, 2 ,,
1/60 ,,	2,5 ,,	1600 ,,	,,	1900 ,,	† ,, 2 ,,

Aus Zbl. Bakter. I Orig., Bd. 54.

Tabelle II.
Kaninchen mit normalen Kaninchenleukozyten und Milzbrandbazillen intraperitoneal injiziert.

Infektionsdosis	Versuchstiere			Kontrolltiere	
	Menge der Leukozyten	Gewicht	Ausgang	Gewicht	Ausgang
1/5000 Oese	2,0 g	1480 g	lebt	1690 g	† nach 3 Tagen
1/2500 ,,	2,0 ,,	1700 ,,	,,	1520 ,,	† ,, 2 ,,
1/1200 ,,	1,8 ,,	1510 ,,	,,	1700 ,,	† ,, 2 ,,
1/640	2,0 ,,	1560 ,,	,,	1620 ,,	† ,, 1 Tage
1/320 ,,	2,0 ,,	1690 ,,	,,	1540 ,,	† ,, 2 Tagen
1/160 ,,	2,0 ,,	1750 ,,	† nach 4 Tagen	1630 ,,	† ,, 1 Tage
1/120 ,	3,0 ,,	2040 ,,	lebt	2040 ,,	† ,, 3 Tagen
1/80 ,,	3,0 ,,	1250 ,	,,	1400 ,,	† ,, 1 Tage

Des weiteren konnte ich dartun, daß dem im Milzbrandimmunserum wirksamen prophylaktischen Antikörper eben die Wirkung zukommt, die negataktische Substanz des Anthraxbazillus zu neutralisieren. Nach diesen Feststellungen war es kaum überraschend, daß es sich erwies, daß die prophylaktische Wirkung des Antistaphylokokkenimmunserums in einer Neutralisierung der negataktischen Substanz des Staphylokokkus bestand, wonach die Zuströmung der Leukozyten zu der Infektionsstelle und die Phagozytose der Kokken anfing. Es hat sich nämlich erwiesen, daß virulente Milzbrandbazillen und Staphylokokken keine Stoffe erzeugen, die den Leukozyten in dem Sinne zuwider sind, daß sie die Phagozytose verhindern. Von mir wurde nachgewiesen, daß virulente Staphylokokken von den Leukozyten ebensogut im Normalserum wie im Staphylokokkenimmunserum aufgenommen werden, und Flaum hat vollständige Phagozytose der Kokken sowohl beim immunisierten als auch beim normalen Kaninchen festgestellt. Durch die Aufnahme der Kokken durch die Phagozyten werden die übrigen Zellen des Körpers vor der Wirkung der von den Staphylokokken erzeugten Gifte geschützt. Allmählich werden die Kokken auch vernichtet. Dies nimmt aber beim Kaninchen geraume Zeit in Anspruch. Kaninchen, bei welchen, nach vorheriger intravenöser Injektion genügend großer Mengen Antistaphylokokkenserums Staphylokokken in die eine Brusthöhle eingeführt werden, können sich erholen, bekommen wieder Freßlust und nehmen an Gewicht zu,

Tabelle III.
Staphylokokken bzw. Staphylokokken und normale Meerschweinchenleukozyten Meerschweinchen intraperitoneal injiziert.

Gewicht der Tiere	Kulturmenge	Leukozytenmenge	Ausfall
270 g	0,5 Oese	—	† am 2. Tage
250 „	0,5 „	0,25 g	lebt
250 „	1,0 „	—	† am 2. Tage
250 „	1,0 „	0,3 g	lebt
250 „	2,0 Oesen	—	† am 2. Tage
250 „	2,0 „	0,5 g	lebt
250 „	3,0 „	—	† am 2. Tage
220 „	3,0 „	0,5 g	lebt
320 „	4,0 „	—	† am 2. Tage
240 „	4,0 „	0,45 g	lebt
260 „	6,0 „	0,75 „	„
270 „	8,0 „	1,2 „	„
270 „	10,0 „	1,2 „	„
250 „	1½ Schrägagarkult.	1,6 „	„
300 „	2 „	2,5 „	„

Aus Z. Immun.forschg, Bd. 81.

Tabelle IV.
Staphylokokken und normale Kaninchenleukozyten Kaninchen injiziert.

Gewicht der Tiere	Menge Staphylokokken	Menge Leukozyten	Einführungsweise	Ausfall
1130 g	6 Oesen	—	intrapleural	† am nächsten Tage
970 „	6 „	0,6 g	„	lebt
850 „	8 „	0,7 „	„	lebt
1300 „	1 Schrägagarkultur	0,9 „	„	lebt
1300 „	1½ dgl.	1,5 „	„	† nach 12 Tagen. Abszesse in Leber, Nieren und subkut. Gewebe
1540 „	1½ „	1,5 „	„	lebt, Gewicht nach 3 Wochen 1800 g, nach 6 Wochen 1910 g
1780 „	2 „	2,2 „	„	† am nächsten Tage, bedeutende Menge dünnes Exsudat in beiden Pleurahöhlen und in der Bauchhöhle

so daß man geneigt wäre, sie als ganz gesund zu betrachten. Wenn man sie tötet, so findet man, oft auch nach längerer Zeit, 4 Monaten oder mehr, kittige, aus den Leukozyten entstandene Massen in der infizierten Pleura. Das am meisten Ueberraschende ist aber, daß daraus angelegte Kulturen Wachstum von Staphylokokken zeigen. Die Staphylokokken sind trotz der Phagozytose offenbar imstande gewesen, sich teilweise am Leben zu erhalten. Erst nach längerer Zeit gehen sie vollständig zugrunde.

Der wichtigste Antikörper der Immunsera gegen den Milzbrandbazillus und den Staphylococcus pyogenes ist der antinegataktische. Ein Antikörper gegen die Toxine der Staphylokokken ist freilich nicht unnütz, im großen ganzen aber nicht nötig. Wenn die Leukozyten sich nicht den Kokken nähern und sie phagozytieren können, so ist die Entwicklung der Kokken nicht zu umgehen. Eine Neutralisierung ihrer Toxine ruft dann nur ein Aufhalten der Symptome hervor, bis das Antitoxin verbraucht ist. Durch die Phagozytose der Kokken werden die gegen ihre Toxine empfindlichen Zellen diesen dauernd entzogen.

Durch Behandlung eines Schafes mit durch vorsichtiges Erwärmen getöteten pyogenen Staphylokokken und mit kokkenfreier Flüssigkeit aus Kulturen in Schafserum bekam ich ein Antiserum, das in bezug auf seine Schutzwirkung beim Kaninchen zweier Fabriksera, von Wellcome und von Parke Davis, ungefähr gleichwertig war (Tab. V). Bei der Untersuchung des

Tabelle V.
Schutzwirkung der Sera.

Nummer und Gewicht der Tiere	Menge Kultur	Serum	
156 1550 g	$^{1}/_{100}$ Oese	—	tot am 4. Tage
157 1750 ,,	$^{1}/_{200}$,,	—	tot am 2. Tage
145 1520 ,,	$^{1}/_{500}$,,	—	tot am 20. Tage, Eiterherde im Herz
154 1550 ,,	$^{1}/_{200}$,,	Schafserum	lebt, Gewicht nach 4 Wochen 2000 g
153 1640 ,,	$^{1}/_{100}$,,	,,	lebt, Gewicht nach 6 Wochen 2610 g
155 1650 ,,	$^{1}/_{50}$,,	,,	lebt, Gewicht nach 11 Wochen 2370 g
155 1650 ,,	$^{1}/_{20}$,,	,,	lebt, Gewicht nach 8 Wochen 2700 g
192 1/10 ,,	$^{1}/_{10}$,,	,,	tot am 19. Tage, kasige Massen mit Kokken in der l. Pleura und im Perikard, keine Herde in den Nieren, Leber oder Herz
129 1660 ,,	$^{1}/_{6}$,,	,,	tot am 3. Tage, serofibrinose Staphylokokkenpleuritis
169 1670 ,,	$^{1}/_{200}$,,	Serum Wellcome	lebt, Gewicht nach 8 Wochen 2670 g
167 1650 ,,	$^{1}/_{100}$,,	dto.	lebt, Gewicht nach 12 Wochen 2280 g
164 1650 ,,	$^{1}/_{50}$,,	,,	krank in den Hinterfüßen, tot am 14. Tage, Gewicht 1230 g, Eiterherde in der l. Niere, in der Brustwand und am l. Sprunggelenk, linksseitige eitrige Pleuritis
195 1650 ,,	$^{1}/_{25}$,,	,,	lebt, Gewicht nach 2 Wochen 1510 g, sieht krank aus, erholt sich, Gewicht nach 7 Wochen 2100 g
129 1660 ,,	$^{1}/_{6}$,,	,,	tot am 3. Tage, linksseitige serofibrinose Pleuritis
173 1650 ,,	$^{1}/_{200}$,,	Serum Parke Davis	lebt, Gewicht nach 9 Wochen 2850 g
171 1650 ,,	$^{1}/_{100}$,,	dto.	lebt, Gewicht nach 8 Wochen 2450 g
170 1650 ,,	$^{1}/_{50}$,,	,,	lebt, Gewicht nach 12 Wochen 2870 g
178 1600 ,,	$^{1}/_{25}$,,	,,	lebt, Gewicht nach 2 Wochen 1140 g, erholte sich, Gewicht nach 9 Wochen 2350 g
191 1650 ,,	$^{1}/_{10}$,,	,,	tot am 16. Tage, Gewicht 1330 g, kittige Masse in der l. Pleura und im Perikardium, Harnblase geborsten, 300 ccm Harn in der Bauchhöhle
193 1950 ,,	$^{1}/_{6}$,,	,,	tot am 6. Tage, Gewicht 1430 g, eitrige, fibrinöse linksseitige, serose rechtsseitige Pleuritis, eitrige Perikarditis, kleine Eiterherde in den Nieren

Schafserums auf den Gehalt von Antikörpern gegen die verschiedenen Toxine der Staphylokokken wies es in gewissen Beziehungen bestimmte Abweichungen auf. Erstens war seine antihämotoxische Wirkung 20—25fach geringer als die der Fabriksera (Tab. VI). Dies war nicht überraschend. Der für die Immunisierung benutzte Staphylokokkus war nämlich, trotz seiner nicht unbedeutenden Virulenz, kein starker Hämolysinbildner, und ferner wurde die Vorbehandlung mit durch Erwärmung getöteten Kokken ausgeführt. Dabei wird aber das Hämotoxin zerstört. Das Vermögen der Sera, die negataktische Substanz zu neutralisieren, wurde durch Untersuchung der Größe des nach subkutaner oder intrakutaner Injektion einer Mischung von virulenten Kokken und Serum bei Meerschweinchen entstandenen Abszesses gemessen. Nach dem Ergebnis dieser Untersuchung (Tab. VII) bestand keine

Tabelle VI.

Standardtoxin ccm . .	0,4	0,4	0,2	0,4	0,4	0,4
Schafserum ccm	0,2 k	0,3 k	0,4 k	0,5 fk	0,6 0	
Serum Wellcome ccm .	0,0005 k	0,001 k	0,002 fk	0,0025 0	0,003 0	0,004 0
Serum Parke Davis ccm	0,0005 k	0,001 k	0,002 k	0,0025 Sp	0,003 0	0,004 0

k = komplette Hämolyse, fk = fast komplette Hamolyse, Sp = Spur Hämolyse, 0 = keine Hämolyse.

Tabelle VII.
Große der nach intrakutaner Injektion entstandenen Eiterherde.

Menge des Serums	Größe des Eiterherdes	
	Schafserum	Wellcomesches Serum
0,0006	2,5 × 1,2 cm	2,0 × 1,0 cm
0,0005	1,8 × 1,0 cm	1,8 × 1,9 cm
0,0004	1,1 × 0,9 cm	1,1 × 1,0 cm
0,0002	1,3 × 0,3 cm	1,4 × 0,4 cm
0,0001	0,8 × 0,4 cm	1,4 × 0,5 cm

Tabelle VIII.
Gehalt der Sera an Antileukozidin.

Leukozyten	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Toxin	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Schafserum	0,05 0	0,1 0	0,2 +++	0,3 +++	0,4 +++
Parke-Davis-Serum	0,05 0	0,1 0	0,2 0	0,3 0	0,4 0
Wellcomeserum	0,05 0	0,1 0	0,2 0	0,3 0	0,4 0

0 = keine Entfärbung, +++ = vollstandige Entfärbung.

größere Differenz zwischen dem Schafserum und den zwei Fabriksera. Dagegen war die antileukozide Wirkung des Schafserums stärker als die der Fabriksera (Tab. VIII). Dies hängt vielleicht davon ab, daß die Flüssigkeit aus der Kultur in Schafserum, mit der das Schaf vorbehandelt wurde, reicher an Leukozidin war als die aus der Bouillonkultur (Tab. IX). Es leuchtet also ein, daß die Antihämotoxine des Staphylokokkenimmunserums weder die hauptsächliche Rolle bei seiner Schutz- und Heilwirkung spielen können, noch in einer konstanten Beziehung zu den wirksamen Immunkörpern stehen. Dagegen steht die Schutzwirkung der drei Sera in guter Uebereinstimmung mit ihrem Gehalt an antinegataktischem Immunkörper.

Die virulenten Pneumokokken bilden wie die Milzbrandbazillen und Staphylokokken negataktische Substanzen, und erst nach deren Neutralisierung strömen die Leukozyten zu den Kokken zu. Betreffs der Phagozytose ver-

Tabelle IX.
Leukozidinbildung von Åso III.

Leukozyten	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
Bouillontoxin . . .	.	.	.	.	0,02 / +++	0,05 / +++	0,1 / +++	0,3 / +++	0,5 / +++
Serumtoxin	0,001 / +	0,002 / 0	0,005 / 0	0,01 / 0	0,02 / 0				

0 = keine Entfärbung, +++ = vollständige Entfärbung.

Tabelle X.

Nummer und Gewicht der Tiere	Menge Kokken	Menge Serum	Menge Leukozyten	Ergebnis
126 1600 g	aus 3 ccm	0,4 ccm Immun.	—	tot am 3. Tage
137 1500 g	aus 3 ccm	0,5 ccm Immun.	—	tot am 7. Tage
134 1370 g	aus 3 ccm	0,3 ccm Immun.	0,7 g	am Leben geblieben
133 1610 g	aus 3 ccm	0,3 ccm Norm.	0,7 g	tot am 3. Tage
122 1500 g	aus 3 ccm	0,45 ccm Immun.	0,45 g	am Leben geblieben
121 1530 g	aus 3 ccm	0,45 ccm Norm.	tot	tot am 3. Tage
125 1550 g	aus 3 ccm	0,5 ccm Immun.	0,5 g	am Leben geblieben
154 1770 g	aus 3 ccm	0,5 ccm Norm.	0,5 g	tot am 3. Tage
184 1650 g	aus 5 ccm	0,5 ccm Immun.	1,1 g	am Leben geblieben

halten sie sich aber ganz andersartig als die letzteren. Außer der negataktischen Substanz erzeugen sie auch eine, die den Leukozyten zuwider ist und die Phagozytose verhindert. Um die Pneumokokken bewältigen zu können, muß der infizierte Tierkörper zwei Antistoffe produzieren, einen, der die Wirkung der negataktischen Substanz aufhebt und eine Zuströmung der Leukozyten zu den Kokken ermöglicht, und außerdem einen, der dem antiphagozytär wirkenden Produkt der Pneumokokken entgegenwirkt. Beide diese Antikörper werden nicht immer in genügender Menge gebildet. Man beobachtet bisweilen, daß die Leukozyten und die Pneumokokken gut gemischt zusammen vorkommen, ohne daß irgendeine Phagozytose eintritt, sondern die Infektion schreitet weiter. Diese Zustand kann man experimentell leicht darstellen durch Injektion von arteigenen Leukozyten und vollvirulenten Pneumokokken bei Kaninchen. Die anwesenden Leukozyten, wie zahlreich sie auch sind, üben nicht den geringsten Einfluß auf den Infektionsverlauf aus. Erst nach der Produktion des nötigen Antikörpers seitens des infizierten Tieres fängt die Phagozytose an, setzt dann aber mit großer Intensität ein, fegt die freien Pneumokokken weg, das Fieber fällt kritisch, und ein Gefühl von Gesundheit stellt sich ein, wie es bei der Krise der akuten kruppösen Pneumonie beim Menschen der Fall ist.

13. Kathe (Breslau):

Hepatitis epidemica in Schlesien [1]).

Mit 2 Abbildungen im Text.

Bei Untersuchungen über die Verbreitung der Leptospirosen in Schlesien stieß ich in Kunitz bei Liegnitz im Herbst 1938 auf gehäufte, mit Gelbsucht einhergehende fieberhafte Erkrankungen in einer dörflichen Bevölkerung, die nach dem ersten Berichte, den ich erhielt, wohl die Vermutung aufkommen lassen konnten, daß es sich um Weilfälle handele, um so mehr, als sie mit einem in unmittelbarer Nachbarschaft des Dorfes liegenden See in ursächlichem Zusammenhang zu stehen schienen.

Die Ermittelungen an Ort und Stelle, die Untersuchung der Erkrankten zeigten aber sofort, daß Morbus Weil auszuschließen war. Von den klassischen Symptomen des infektiösen Ikterus bestand zwar die Gelbsucht; es fehlten aber die Nierenerscheinungen und die so kennzeichnenden Muskelschmerzen, besonders in den Waden.

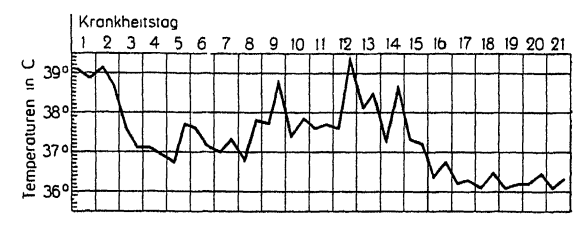


Abb. 1.

Der Krankheitsverlauf läßt sich ganz kurz folgendermaßen charakterisieren: die Affektion setzte plötzlich mit Müdigkeit, Mattigkeit, Uebelkeit, Frösteln, Schmerzen im Epigastrium und Durchfällen ein. Die Temperatur stieg auf 39° und darüber, hielt sich einige Tage auf dieser Höhe und sank dann wieder ab. Nicht selten traten Rezidive ein: zu zeitiges Aufstehen, Anstrengungen wirkten nach dieser Richtung offenbar begünstigend. Die Rezidive verliefen im allgemeinen schwerer als der erste Anfall.

Am 3. oder 4. Tage der Erkrankung war die Leber deutlich vergrößert und tastbar, im späteren Verlaufe dann auch die Milz. Etwa am 4. Tage setzte Gelbsucht ein, die recht erheblich in einzelnen Fällen wurde. Der Harn war dementsprechend durch seinen Gehalt an Gallenfarbstoffen braunbierfarben, der Stuhl mehr oder minder acholisch. Mit dem Auftreten der Gelbsucht trat im allgemeinen eine Besserung im Allgemeinbefinden ein.

Auch bei dieser Krankheit gibt es alle Uebergänge von den leichtesten, nur im Rahmen einer Epidemie zu diagnostizierenden Fällen, bis zu ganz schweren Formen, die das Bild der akuten gelben Leberatrophie zeigen und vermutlich auch mit ihr identisch sind.

1) Aus dem Staatl. Mediz. Untersuchungsamt Breslau (Direktor: Prof. Dr. Kathe).

Die Storungen der Leberfunktion kommen in den mehr oder minder stark positivem Ausfall der Reaktion nach Takata Ara zum Ausdruck. Wir haben sie bei keinem der von uns genauer untersuchten Kranken vermißt und zum Teil sehr hohe Werte bekommen, die auf eine tiefgreifende Schadigung des Leberparenchyms schließen ließen.

Von unseren Kunitzer Patienten, von denen keiner starb, waren einige nur wenige Tage krank, andere mehrere Wochen; eine dreißigjahrige Frau, die wir schon aufgegeben hatten, erholte sich schließlich nach mehrmonatigem Krankenlager. Allerdings ist bei ihr noch nicht zu sagen, ob die schwere Schadigung des Leberparenchyms sich wieder ganz ausgleichen lassen wird, und ob es nicht zu einem zirrhotischen Prozeß kommt.

Was die Aetiologie anbetrifft, so erstreckten sich unsere Untersuchungen nach allen in Betracht kommenden Richtungen; sie waren kultureller, serologischer und tierexperimenteller Natur. Wir haben auch einen Affenversuch gemacht, indem wir Blut eines Patienten, der allerdings schon am 8. Krankheitstage war, dem Tier intraperitoneal injizierten. Der Affe blieb vollig gesund. Ganz entsprechende Beobachtungen sind auch schon von schwedischen Forschern gemacht worden.

Wir mussen also zunachst wohl annehmen, daß es sich um eine Viruskrankheit handelt, die unter den ublichen Versuchsbedingungen anscheinend auf keine Tierart zu ubertragen ist.

Wie ich schon sagte: an der infektiosen Natur dieser Erkrankungen ist mir kein Zweifel. Wohl alle Autoren, die sich bisher mit ihr befaßt haben, sind zu derselben Auffassung gelangt. Aus jungster Zeit erwahne ich nur Per Selander in Goteborg und Holm in Hamburg.

Für die infektiose Natur des Leidens spricht neben dem fieberhaften, mit Milz- und Leberschwellung einhergehende Verlauf vor allem die Verbreitungsweise der Krankheit.

Das Dorf Kunitz hat eine in der Landwirtschaft tätige Wohnbevolkerung von 934 Kopfen; es grenzt unmittelbar an einen 400 Morgen großen See. Rund Zweidrittel der Einwohner gehoren den Altersstufen von 21 Jahren und daruber an. Die Gesamtzahl der Kinder und Jugendlichen bis zum vollendeten 20. Lebensjahre beträgt 233; darunter sind 225 Kinder, also 24 v. H. der Wohnbevolkerung, im Alter von 0—14 Jahren.

An der Seuche erkrankten in der Zeit von Juli bis November 1938 132 Personen, das sind rund 14 v. H. der Wohnbevolkerung. Wenn man aber die Erkrankungen auf den Bestand der einzelnen Altersstufen verteilt, so ergeben sich sehr bemerkenswerte Unterschiede. Es erkrankten:

von allen Kindern bis zum 14. Lebensjahre . . . . . 46,7 Proz.,
„ „ Jugendlichen von 15—20 Jahren . . . . . . 13,9 „
„ „ Erwachsenen jenseits des 20. Lebensjahres . 2,0 „

Die Kunitzer Seuche war also eine ausgesprochene Kinderkrankheit; sie zeigte fur diese Altersstufe einen ungewohnlich hohen Kontagionsindex. Ich nehme an, daß diese eigenartige Altersverteilung der Erkrankungen dadurch bedingt wurde, daß der Erreger ziemlich verbreitet ist, und daß viele Menschen im Laufe des Lebens durch unterschwellige Infektionen eine stumme Feiung im Sinne einer Dauerimmunität bekommen.

Die Zahl der Erkrankungen betrug im Juli 4, im August 35, im September 32, im Oktober 39 und im November 22.

Seit dem Dezember ist kein neuer Fall mehr aufgetreten. Auch nach den Beobachtungen in Schweden und in Hamburg besteht offenbar eine ausgesprochene zeitliche Disposition hinsichtlich des Spatjahres.

Wir haben den Seuchengang genau verfolgt[1]), sowohl hinsichtlich der Verbreitung im Dorf als auch in der Schule, aber keine Besonderheiten feststellen konnen, abgesehen davon, daß eine Haufung in einzelnen Familien auftrat. In einer kinderreichen Familie konnten wir 5 Erkrankungen feststellen, in einer Hausgemeinschaft 9.

Bei unseren Ermittelungen erhielten wir zunächst regelmäßig die Auskunft, daß der Erkrankte vor dem Auftreten der Krankheitserscheinungen im See gebadet oder doch im Wasser herumgepanscht hatte; wir waren infolgedessen geneigt, dort die Infektionsquelle zu suchen. Da sich aber die Neuerkrankungen bis zum November hinzogen, kann der Kontakt mit dem Seewasser zumindest nicht die alleinige Ursache der Seuche gewesen sein.

Wie meist unter solchen landlichen Verhältnissen bildet auch in Kunitz der unmittelbar vor den Türen gelegene See den naturlichen Vorfluter, in den die Abwässer geleitet werden. Der dem Dorfe nahe gelegene Teil des Sees soll zu Beginn der Seuche durch eine Wasser- bzw. Abwasserflora stark verunreinigt gewesen sein; andererseits bildet gerade dieses Gebiet des Sees aus Bequemlichkeitsgrunden den Haupttummelplatz fur die Badenden.

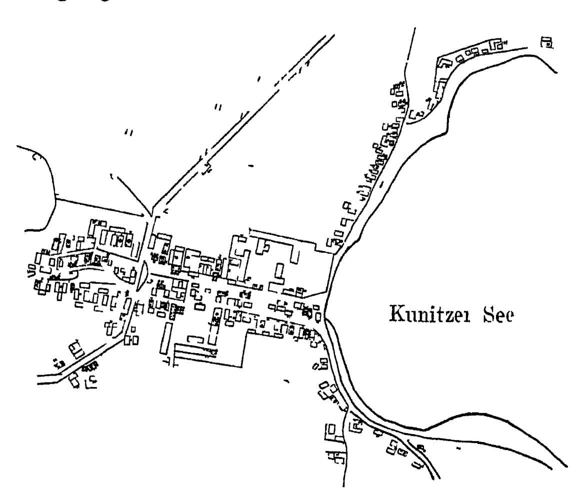


Abb. 2. Dorfplan von Kunitz. •• = Erkrankungen.

Daß die Uebertragung von Mensch zu Mensch eine Rolle spielt, ist wohl außer Zweifel. Ob sie durch Kontakt, ob sie durch Tropfcheninfektion erfolgt, konnen wir auf Grund unseres bisherigen Beobachtungsgutes noch nicht entscheiden; vermutlich ist der letztere Infektionsmodus von ausschlaggebender Bedeutung.

Die Inkubationszeit scheint 2—4 Wochen zu betragen. Mit genesenen Virusträgern ist zu rechnen, wie die Heimkehrfälle beweisen, die von Per Selander und Holm beobachtet wurden.

Ueber die Dauer der durch die Erkrankung bedingten Immunität fehlen uns bisher eigene Beobachtungen, abgesehen von der indirekt zu verwertenden Altersverteilung der Erkrankungen in Kunitz. Wir dürfen wohl, wie schon erwahnt, mit einer Dauerimmunität rechnen.

Die Kunitzer Seuche gehort zu den Affektionen, für die Virchow 1864 die Bezeichnung Icterus catarrhalis prägte, da er von der Vorstellung ausging, daß es sich um eine katarrhalische Entzündung der Gallenwege und einen mechanischen Verschluß der Papilla Vateri durch den schon so viel erorterten Schleimpfropf handele.

---

1) Fur Unterstutzung bei diesen Feststellungen bin ich dem zustandigen Amtsarzt, Herrn Med.-Rat Dr. Buurmann, Herrn Dr. Keil vom stadt. Gesundheitsamt Liegnitz, der Gemeindeschwester von Kunitz, Kathe Prange, und Herrn Kantor Simon zu großem Danke verpflichtet.

Eppinger hat nun im Kriege an Gelbsucht erkrankte, trotzdem diensttuende und durch Verwundung gestorbene Soldaten eingehend untersucht und dabei festgestellt, daß eine derartige katarrhalische Entzündung nicht besteht, wohl aber eine diffuse Destruktion des Leberparenchyms mit Schwellung der Leberzellen und multipeln kleinen Nekroseherden. Eppinger bezeichnete den Zustand daher als eine „forme fruste“ der akuten gelben Leberatrophie.

Lindstedt prägte für diese bisher als Icterus catarrhalis bezeichnete Erkrankung dann den Namen Hepatitis epidemica. Die Infektionskrankheit tritt meist sporadisch oder in kleinen Herden auf, sie bevorzugt enge Wohngemeinschaften, Schulklassen, Arbeiterkompagnien, Mannschaftsstuben des Heeres. Sie war im Weltkriege häufig; sie ist eine ausgesprochene Soldatenkrankheit und seit langem als solche bekannt. Die Franzosen nannten sie im Kriege „Jaunisse des champs“.

Nach dem Weltkriege war sie in England und Amerika recht verbreitet; seit 1924/25 tritt sie in den skandinavischen Ländern in starker Häufung auf. Per Selander in Göteborg schrieb mir, daß die Hepatitis epidemica seit 1932 zusammen mit der Weilschen Krankheit und der akuten gelben Leberatrophie in Schweden meldepflichtig wurde, und daß in den Jahren von 1931 bis 1937 in Schweden fast 9000 Fälle festgestellt sind.

Auch für Schweden ist kennzeichnend, ebenso übrigens wie für die Hamburger Epidemie der Jahre 1932—1937, die von Holm beschrieben wurde, und eine frühere von 1921 in Kiel, über die Beyreis berichtete, daß hauptsächlich das jugendliche Alter befallen wird, und daß ein Tiefstand der Morbiditätskurve jedesmal im Sommer erreicht wird.

In Schlesien hat es schon immer sporadische Fälle des sog. Icterus catarrhalis gegeben, aber noch nie erlebten wir in den fast 30 Jahren, die ich überblicken kann, eine Epidemie wie in Kunitz. Das erscheint mir beachtlich! Zur gleichen Zeit wie in Kunitz entwickelte sich, wie ich aus Mitteilungen und Einsendungen von Untersuchungsmaterial durch Herrn Dr. Sorgenfrei, dem Leiter des Staatl. Rheuma-Institutes und des bakteriologischen Laboratoriums in Bad Elster entnehme, dort und in dem benachbarten Brambach genau unter den gleichen Erscheinungen eine Hepatitis epidemica-Epidemie, die zunächst für Morbus Weil gehalten wurde.

Nachdem erst einmal lokal das Interesse für diese Frage geweckt war, erhielt ich Berichte und Untersuchungsmaterial aus den verschiedensten Gebieten Schlesiens, von Einzelfällen und kleineren Krankheitsherden, auch aus dem Sudetengau und aus dem Breslauer Standortlazarett von Soldaten, die in der Septemberzeit im Westen gestanden hatten und von dort mit Gelbsucht zurückgekehrt waren.

Ich möchte keine sichere Prognose stellen, aber ich habe den Eindruck, daß die Welle der Hepatitis epidemica, unter deren Auswirkungen zurzeit die skandinavischen Länder stehen, bereits zu uns nach Deutschland herübergreift, und ich vermute, daß wir in steigendem Maße Gelegenheit haben werden, uns mit dieser Seuche zu beschäftigen.

Bisher ist sie — jedenfalls geht das aus den vorliegenden Veröffentlichungen hervor — im wesentlichen von Internisten bearbeitet worden. Das Problem der Klärung der Aetiologie harrt noch der Lösung. Insofern haben wir Mikrobiologen noch ein besonderes Interesse an dieser Infektionskrankheit, und deswegen erlaubte ich mir, über die Kunitzer Seuche kurz zu berichten.

Schrifttum.

Beyreis, Otto, Eine Ikterusepidemie. Münch. med. Wschr. **1922**, Nr 28, 1044. — Selander, Per, Hepatitis epidemica (Icterus catarrhalis sporadicus et epidemicus). Kinderärztliche Praxis, 8. Jahrg., H. 5 u. 6. — Holm, Kurt, Die Gelbsucht in den Wilhelmsburger Zinnwerken (eine „Hepatitis epidemica"). Arbeitsmedizin **1939**, H. 8.

Aussprache.

v. Bormann (Bremen):

Gemeinsam mit Kameraden Bader, Deines und Unholz habe ich Gelegenheit gehabt, eine Reihe von Dorfepidemien der Hepatitis epidemica 1937—1938 zu untersuchen. Zunächst handelte es sich um einige Dörfer in der Umgebung von Heidelberg. Da Gelbsucht in der Heidelbergumgebung endemisch ist, nie allerdings in dem Ausmaße wie 1936—38 aufgetreten war, dachte ich zunächst an eine lokale Epidemie. Später konnten wir ähnliche Epidemien in Franken, Württemberg, Hannover, Bremen und Hamburg feststellen. Wie wir heute von Herrn Kathe gehort haben, blieb auch Schlesien davon nicht verschont. Man gewinnt den Eindruck, daß im Laufe der letzten Jahre eine Gelbsuchtepidemie vorübergezogen ist bzw. sich noch im Anzuge befindet. Die Infektiosität der Hepatitis epidemica steht auch für uns fest. In einem badischen Dorf, daß von Gelbsucht heimgesucht war, fanden wir einen Haushalt, wo ein Junge, der sich sonst in Wertheim in einem Internat aufhielt, über Weihnachten wahrend der Epidemie zu Hause zu Besuch weilte. Nach seiner Rückkehr nach Wertheim erkrankte er an Gelbsucht. Unser Besuch im Internat, wo etwa 25 Jungen untergebracht waren, hat ergeben, daß über Weihnachten zwei Gelbsuchtsfälle eingeschleppt waren. Der obige und ein zweiter aus einem anderen ebenfalls Gelbsuchtverseuchten Dorfe. 10—14 Tage später traten unter den Internatinsassen zwei Gelbsuchtfälle auf und eine Reihe von weiteren Schülern klagten vorübergehend über Schmerzen in der Lebergegend, waren appetitlos, erbrachen — ohne einen Ikterus zu entwickeln. Das Krankheitsbild in unseren Epidemien war das gleiche wie in der schlesischen. Wir konnten allerdings 2 Todesfälle vermerken. Einige Fälle zeigten derartige Schmerzen in der linken Bauchhälfte, daß sie als Blinddarmentzündung operiert waren. Auch wir konnten keinen Erreger feststellen. Blutkulturen, Tierversuche versagten. Komplementbindung mit Antigenen aus verschiedenen Leptospirenstämmen blieb stets negativ. Agglutinine der Typhus-Paratyphus-Gruppe konnten nicht nachgewiesen werden. Intestinalprotozoen (auch im Duodenalsaft) waren für gewohnlich nicht vorhanden. Im Stuhl konnten keine pathogenen Keime festgestellt werden. Verbindungen mit irgendwelchen Tierseuchen waren nicht da (auch nicht mit der in der dänischen Literatur erwähnten Schweinegelbsucht). Beziehungen zu der Grippe waren bestimmt nicht vorhanden. Verbindungen mit der Landschaft bzw. Ernährungsweise der Bevolkerung — ebenfalls. Trotzdem halte ich es nicht für möglich, bereits jetzt sich auf Virusätiologie der Hepatitis epidemica festzulegen. Auch der Infektionsmodus entspricht jedenfalls, nachdem was uns über Viruskrankheiten bis jetzt bekannt geworden ist, in keiner Weise der Virushypothese. Eine Infektion tritt nur durch ein mehrmaliges näheres Zusammensein mit dem Kranken (Kinder, die ein Bett teilen; Spielkameraden; Wohngemeinschaften u. ä. m.). Ohne mich irgendwie festzulegen, möchte ich hier die Möglichkeit erwähnen, daß banale Darmbakterien-Enterokokken, Coli oder ähnliche hier eine Rolle spielen könnten. Und zwar ähnlich wie Pneumokokken, die manchmal nach entsprechender Pathogenitätszunahme durch vorherige Menschenpassage kleine Epidemien auslösen konnen, konnten vielleicht auch Darmbakterien von einem spontanen infolge eines Diätfehlers bzw. einer Ueberanstrengung u. ä. m. entstandenen Ikterusfall ausgehend Duodenitis-Hepatitis Ausbreitung verursachen.

— ———

2. Tag: Dienstag, den 28. März 1939.

Vormittags.
Versammlungsleiter: Janke (Wien) und Demeter (Weihenstephan/München).

Nachmittags.
Versammlungsleiter: Rippel (Göttingen) und Seelemann (Kiel).

Sammelbericht III: C. Stapp (Berlin-Dahlem)[1]):

Bakterielle Pflanzenerkrankungen.

Mit 16 Abbildungen im Text.

Zum ersten Male seit Bestehen der Deutschen Vereinigung für Mikrobiologie wird ein Thema zur Diskussion gestellt, das sich mit parasitären Krankheiten bei Pflanzen befaßt. In der mir zur Verfügung stehenden Zeit hierüber einen erschöpfenden Sammelbericht zu geben, ist natürlich unmöglich; ich will jedoch versuchen, Ihnen wenigstens einen allgemeinen Ueberblick über den jetzigen Stand dieses großen Arbeitsgebietes zu vermitteln, wobei verständlicherweise die in Deutschland auftretenden Krankheiten bevorzugt Berücksichtigung finden sollen.

Es mag dem Mediziner vielleicht etwas befremdlich erscheinen, daß wir Phytopathologen von Krankheiten auch bei den Pflanzen sprechen, doch läßt sich vom biologischen Standpunkt aus die Berechtigung hierzu, wie Ihnen meine Darlegungen zeigen werden, nicht bestreiten. Wir kennen neben den parasitären auch eine ganze Reihe nichtparasitärer Pflanzenkrankheiten. Unter den parasitären nehmen, was ihre Häufigkeit betrifft, die Mykosen, also die durch Pilze hervorgerufenen Krankheiten, die erste Stelle ein, dann erst folgen die Bakteriosen. In der Medizin ist es umgekehrt: Die Bakteriosen sind weit häufiger als die pilzlichen Erkrankungen.

Den Grund hierfür sieht Gäumann (11) in einer thermischen Selektion. Es gibt nämlich nur wenige Pilze, die bei Bluttemperatur zu gedeihen vermögen.

Entsprechend der Vielzahl der Pflanzenfamilien, ihrer Genera und Spezies ist aber dennoch die Zahl der bis jetzt bekannten pflanzlichen Bakteriosen wesentlich größer als diejenige der bakteriellen Krankheiten des Menschen und der Tiere.

Obgleich bereits im Jahre 1879 von dem Amerikaner Burrill (7) der erste Nachweis einer durch Bakterien an Pflanzen (Obstgehölzen) hervorgerufenen Krankheit erbracht wurde, setzte erst um die Jahrhundertwende das weitere Studium der bakteriellen Pflanzenkrankheiten mit Erfolg ein. Bahnbrechend waren vor allem die vielseitigen und ausgezeichneten Arbeiten des Nordamerikaners Erwin F. Smith (34) auf diesem Gebiete. Er konnte

1) Aus der Biologischen Reichsanstalt fur Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem.

im Jahre 1920 (35) bereits 150 verschiedene Pflanzengattungen aufzählen, bei denen bakterielle Krankheiten beschrieben waren. Heute liegt deren Zahl noch erheblich höher. Wenn auch sehr viele der bakteriellen Parasiten nicht nur für eine bestimmte Pflanzenspezies, ja häufig nicht einmal nur für Arten desselben Pflanzengenus pathogen sind, so ist das keineswegs verwunderlich, denn menschenpathogene Bakterien sind doch vielfach auch pathogen für Tiere. Andererseits kennen wir aber auch streng spezifisch an eine bestimmte Pflanzenart angepaßte Bakterien. In der Familie der Gramineen, zu der auch unsere Getreidearten gehören, sind z. B. etwa 12—15 verschiedene Bakteriosen bekannt; von ihren Erregern sind allein 7 nur für eine einzige Wirtspflanzenart pathogen[1]).

Dagegen erwies sich beispielsweise der Erreger einer auch in Deutschland häufig zu beobachtenden Fliederkrankheit, Pseud. syringae, nicht nur für Syringe pathogen, sondern gleichzeitig für Orangen, Birnen, Pappeln, Eichen, Buchweizen sowie Tomaten, Chrysanthemen, Levkojen und andere krautige Gewächse (10, 45, 6), also für Vertreter im botanischen System weit auseinanderstehender Familien.

Was die pflanzenpathogenen Bakterien als solche betrifft, so interessiert hier die Frage: Ist es eine ganz bestimmte Gruppe von Bakterien, denen diese Eigenschaften zukommen, oder sind es, wie in der Human- und Veterinärmedizin verschiedenartige Kokken, sporenbildende und nichtsporenbildende Stäbchenbakterien, Vibrionen u. dgl. Hierzu sei gesagt: Bisher ist nicht in einem einzigen Falle der einwandfreie Nachweis erbracht, daß Vertreter der Familie der Coccaceen oder Vertreter der Gattung Bazillus, also der Sporenbildner, pflanzenpathogene Eigenschaften besitzen. Alle anders lautenden Literaturangaben haben sich bei exakter Nachprüfung nicht bestätigen lassen. Unter den mit Sicherheit pathogenen Bakterien befinden sich einerseits unbewegliche, also geißellose, andererseits aber auch sowohl peritrich wie polar begeißelte Stäbchenbakterien. Unter den letzteren ist eine Gruppe ganz besonders vorherrschend: Es sind das die Fluoreszenten, denen in der Human- und Veterinärmedizin keineswegs eine derartige Bedeutung zuzusprechen ist.

Ob unter den bakteriellen Pflanzenparasiten auch für Mensch und Tier pathogene Vertreter vorkommen oder umgekehrt, diese Frage ist bis jetzt jedenfalls zu verneinen.

Hinsichtlich der Virulenzerhaltung pflanzenpathogener Bakterien auf künstlichen Substraten ist zu sagen, daß ein großer Teil von Reinkulturen seine Virulenz erst nach mehreren Jahren verliert, daß sogar vereinzelt Kulturen existieren, die sich 30 und mehr Jahre in voller Virulenz haben weiterzüchten lassen (Pseud. tumefaciens, Bact. phytophthorum); unter letzteren findet sich bisher aber kein Fluoreszent. Vielfach tritt der Virulenzverlust zeitlich bei Stämmen derselben Bakterienspezies sehr unterschiedlich auf (Pseud. tumefaciens, Pseud. tabaci). Bestimmte Bakterienarten büßen ihre Virulenz regelmäßig kurz nach der Isolierung, andere nach wenigen Monaten restlos ein (Pseud. solanacearum, Pseud. begoniae).

Es muß überraschen, daß sich die pflanzenpathogenen Bakterien im allgemeinen gut auf neutralem Bouillonagar entwickeln und hierauf ihre Virulenz weniger gefährdet ist als auf Nährböden pflanzlichen Ursprungs. Für einige wenige hat sich bisher der Kartoffelagar zur Weiterzucht geeigneter erwiesen (Bact. sepedonicum, Pseud. begoniae). Nährböden mit Zucker-

1) Es sind das: Bact. stewartii und Pseud. dissolvens, pathogen nur für Mais, Pseud. vasculorum und Pseud. albilineans nur für Zuckerrohr, Pseud. oryzae für Reis, Pseud. atrofaciens für Hafer und Pseud. translucens für Gerste.

zusatz wirkten sich auf die Virulenz ungünstig aus. Aus demselben Grunde war auch Bierwürzeagar unzweckmäßig.

Wenn nunmehr auf die Art und Weise der bakteriellen Infektion bei den Pflanzen und die Pathogenese eingegangen wird, so darf wohl unterstellt werden, daß die Unterschiede zwischen Pflanze, Tier und Mensch im anatomischen Aufbau und den physiologischen Funktionen in diesem Kreise bekannt sind und auf nähere Darlegungen in dieser Richtung verzichtet werden kann. Das Eindringen der bakteriellen Parasiten in den Wirt erfolgt entweder durch die Spaltöffnungen oder auf dem Wege über etwa vorhandene Wunden. Es gibt eine ganze Reihe von pathogenen Bakterienarten, für die nur der letztere Infektionsweg möglich ist; zu ihnen gehören natürlich alle diejenigen Spezies, die keine Eigenbewegung besitzen. aber auch solche, die begeißelt sind. Durch die Stomata einzudringen vermögen anscheinend alle Fluoreszenten. Der Weg unmittelbar durch die Kutikula hindurch ins Pflanzeninnere ist den Bakterien — zum Unterschied von gewissen Pilzen — völlig verschlossen. Bei der Stomatalinfektion ist die der Blätter oder der jungen saftiggrünen Triebe am häufigsten, aber auch solche der noch unreifen Früchte ist nicht selten. Wundinfektionen nehmen ihren Ausgang häufiger vom Boden aus, wo Beschädigungen durch Insektenfraß, Geräte bei der Bodenpflege u. dgl. verursacht werden.



Abb. 1. „Adernschwarze" des Kohls; Erreger: Pseudomonas campestris. Ausschnitt aus einem kranken Kohlblatt, aufgenommen im durchfallenden Licht.

Erwähnenswert sind in diesem Zusammenhang Beobachtungen von McLean und Lee (27, 28) an Citrus-Blättern, die es wahrscheinlich machen, daß Verschiedenheiten in der Anfälligkeit bei Pflanzen, deren Infektion stomatal erfolgt, u. a. auf einen unterschiedlichen strukturellen Bau der Spaltöffnungen zurückzuführen sind, wobei die Dicke der Kutikular- leisten der Schließzellen und die Spaltöffnungsweite von ausschlaggebender Bedeutung zu sein scheinen.

Ist der Parasit durch die Stomata ins Pflanzeninnere gelangt, so kann er entweder von der Atemhöhle aus in den Interzellularen vordringen, oder aber die Infektion schreitet intrazellular, d. h. also von Zelle zu Zelle fort. Zuweilen verläuft die Ausbreitung sowohl inter- wie intrazellular. In manchen Fällen von Stomatalinfektion an Blättern nimmt der Parasit seinen Weg durch die Interzellularen direkt zu den feinen Tracheiden und gelangt von hier aus in die größeren Gefäße, also die Hauptleitungsbahnen der Pflanze.

Je nach Ausbreitungsart sind auch die Krankheitssymptome, wie später gezeigt wird, verschieden. Aber selbst bei ein und derselben Krankheit können wiederum Unterschiede zutage treten, weil nicht die Wirtspflanze und der jeweilige Parasit allein hierbei maßgebend sind, sondern in vielen Fällen klimatische und Witterungsfaktoren, vor allem Temperatur und Feuchtigkeit wesentlich mitbestimmend sein können. Daß gerade die Temperatur

bei Pflanzenkrankheiten eine größere Rolle spielt als bei menschlichen Erkrankungen, wird verständlich, wenn man berücksichtigt, daß die Pflanzen keine Eigentemperatur besitzen, sondern poikilotherm sind.

Epidemiologisch ist die Witterung überhaupt von ausschlaggebender Bedeutung.

Hinsichtlich der Inkubationszeit, die wir auch bei Infektionskrankheiten der Pflanzen kennen, sei gesagt, daß sie nicht nur in Abhängigkeit steht von der jeweiligen Wirtspflanze und ihren Umweltbedingungen, sondern auch jahreszeitlich von unterschiedlicher Dauer sein kann.

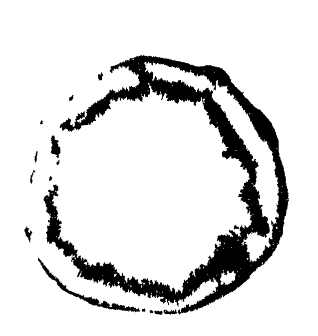




Abb. 2. „Adernschwärze" des Kohls. Quer- und Längsschnitt eines Stengelstückes der gleichen Kohlpflanze wie Abb. 1.

Bei den bakteriellen Gefäßkrankheiten, den sog. Tracheobakteriosen, erfolgt die Ausbreitung der Bakterien innerhalb der Leitungsbahnen. Es kann in solchen Fällen bereits eine starke Verseuchung des Wirtes durch den Parasiten vorliegen, ohne daß sich äußerlich auch nur die geringsten Anzeichen einer Erkrankung feststellen lassen. Oder die einzigen makroskopisch erkennbaren Anzeichen sind schwache Dunkelfärbungen des feinen Adernnetzes der Blätter.

Es dürfte zweckmäßig sein, an einigen Beispielen verschiedene Krankheitsarten, ihre entsprechenden Symptome und teilweise auch ihre Erreger kurz zu demonstrieren[1]).

Bei Brassica oleracea, dem Weißkohl, kennen wir eine Tracheobakteriose mit den letztgenannten Symptomen (34). Die feine dunkle Adernzeichnung ist fast niemals auf der ganzen Blattfläche erkennbar, sondern meist auf kleinere Partien derselben beschränkt (s Abb. 1). Daß eine solche Pflanze trotz der geringen Anzeichen stark verseucht ist, läßt der Querschnitt des Stengels erkennen, auf dem sämtliche der peripher angeordneten Leitbündel dunkelschwarz

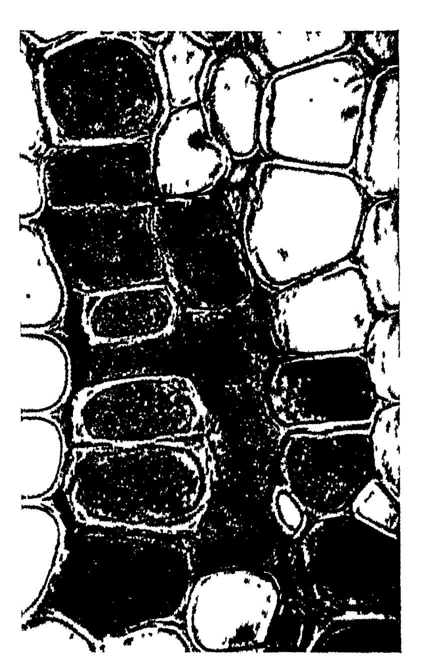


Abb. 3. „Adernschwärze" des Kohls. Mikrotomschnitt durch das kranke Gewebe einer Kohlpflanze; stark vergrößert; nach E. F. Smith.

1) Die Demonstration erfolgte an Hand einer größeren Zahl von Lichtbildern, von denen hier jedoch nur eine beschränkte Anzahl gebracht werden kann.

verfärbt sind (siehe Abb. 2). Wird ein Teilstück eines derartigen Stengels (Mikrotom-Querschnitt) bei stärkerer Vergrößerung im Mikroskop untersucht, so zeigt sich, daß die Tracheen vollgepfropft sind mit Bakterien und daß auch bereits einige Nachbarzellen mit Bakterien angefüllt sind (siehe Abb. 3). Da bei dieser Krankheit keine Erweichung des Gewebes auftritt, so sprechen wir hier von einer Trockenfäule. Der Erreger dieser „Adernschwärze", Pseud. campestris, ist ein polar begeißeltes, auf Bouillon- und Kartoffelagar gelbliche Kolonien bildendes Bakterium. Bei sehr frühem Befall der Pflanze kommt es zu Wuchsstockungen und unzureichender Blattentwicklung, bei spätem wird eine Entwicklungsbeeinträchtigung nicht mehr sichtbar.

Eine Adernfärbung der Blätter, die der des Kohls ähnlich, zumeist aber deutlicher ist, haben wir auch bei einer erst seit 1935 in Deutschland bekannten Begonienbakteriose (57, 50) (siehe Abb. 4). Sie tritt hier anscheinend aber nur auf bei besonders hoher Virulenz des Erregers, sonst kommt es zunächst meist nur zu Blattflecken, die in vielen Fällen die ersten Anzeichen



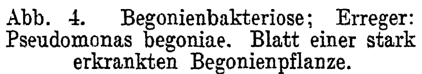


Abb. 4. Begonienbakteriose; Erreger: Pseudomonas begoniae. Blatt einer stark erkrankten Begonienpflanze.



Abb. 5. Begonienbakteriose. Blattflecke an Begonie, die entstehen bei geringerer Virulenz des Erregers als in Abb. 4.

von Stomatalinfektionen sind. Die Blattflecken erscheinen anfänglich glasig-durchsichtig, werden dann zentral nekrotisch und braun (siehe Abb. 5); mit fortschreitender Erkrankung fließen sie mehr oder weniger zusammen, wodurch die Assimilationsfläche der Blattlamina entsprechend verkleinert und damit der Kohlehydratstoffwechsel reduziert wird. Fallen die Blätter ab, ehe der Erreger durch die Gefäße des Blattstieles in den Stengel abgewandert ist, dann kann die Pflanze wieder gesunden; ist der Stengel aber bereits infiziert, so geht unweigerlich die ganze Pflanze ein. Der Erreger dieser Begonienbakteriose ist morphologisch und kulturell dem Erreger der Kohlbakteriose sehr ähnlich, doch nicht mit ihm identisch. Er kommt sowohl in R- als auch in S-Form vor und kann durch Entwicklung von Sekundärkolonien aus S-Formen R-Formen vortäuschen. Die R-Formen erwiesen sich nicht als konstant. Da nach Arkwright (2), Scholtens (33) u. a. Glattformen von Bact. typhi virulent, Rauhformen dagegen avirulent sind, wurde geprüft, ob solche Virulenzunterschiede auch bei diesen Bakterien vorlägen. In der Pathogenität der R- und S-Formen von Pseud. begoniae zeigten sich aber keine Verschiedenheiten (50).

In manchen Fällen von Gefäßbakteriosen kennzeichnen partielle Welkeerscheinungen der Pflanze schon rein äußerlich den Weg des Para-

siten im Wirt. Das läßt sich durch künstliche Impfung z. B. bei der sog. „Tomatenwelke“ gut zeigen. Wird der Erreger mittels Einschnittes in den Stengel seitlich eingeimpft, so welken zunächst alle die Blätter bzw. Blattteile, die mit dem hierbei getroffenen Leitbündelstrang ober- und unterhalb in unmittelbarem Zusammenhang stehen, bald zeigt sich auch ein Absterben der Triebspitze, während einzelne Blätter dazwischen noch völlige Turgeszenz besitzen (siehe Abb. 6). Der Angriff des Erregers beschränkt sich auch hier nicht allein auf die Gefäße. Er greift später mehr oder weniger tief auf das Nachbargewebe, vor allem im Stengel der Tomate, über und verursacht Gewebszerstörungen, die auf Längs- und Querschnitten vielfach schon mit bloßem Auge als Hohlräume erkennbar werden. Die Krankheit ist in Deutschland seit 1927 bekannt (17) und hat in den mitteldeutschen Tomatenanbaugebieten erheblichen Schaden verursacht, bevor man wußte, in welcher Weise wirksame Bekämpfungsmaßnahmen durchzuführen sind.



Abb. 6. Bakterielle Tomatenwelke; Erreger: Bact. michiganense. Partielle Welkeerscheinung nach künstlicher Infektion. Pfeil zeigt Infektionsstelle an. Etwa $^1/_3$ natürlicher Größe.

Der Erreger, Bact. michiganense, ist ein relativ kleiner, völlig unbeweglicher, grampositiver Mikroorganismus, der also nur als Wundparasit wirksam werden kann. Seine Verbreitung erfolgt entweder durch Samen — die Möglichkeit derartiger Sameninfektionen ist bei allen Tracheobakteriosen gegeben — oder die Pflanzen werden vom Boden aus infiziert, oder aber die Uebertragung erfolgt von erkrankten Einzelpflanzen aus in den Quartieren durch die von den Gärtnern bei der Heranzucht der Tomaten geübte Methode des „Ausgeizens“, d. h. des jeweiligen Entfernens der Achseltriebe zwecks Förderung des Fruchtansatzes, das teilweise mit den Fingern, teilweise mit dem Messer geschieht (29, 13).

Ferner soll hier eine Tracheobakteriose an Kartoffeln erwähnt werden, die den Namen „Ringfäule“ führt. Sie gehört zu denjenigen Gefäßkrankheiten, die sich äußerlich an der Kartoffelpflanze meist überhaupt nicht feststellen lassen. Bei besonders schwerer Erkrankung bleiben die Pflanzen höchstens im Wuchs ein wenig zurück. Auch die Knollen lassen äußerlich keinerlei Schädigung erkennen. Werden sie aber durchschnitten, so sehen wir den peripheren Gefäßbündelring schwach gelblich-glasig verfärbt (siehe Abb. 7) und beim Einstechen in die meist schmale kranke Ringzone zeigt sich, daß diese erweicht ist. Der Erreger, Bact. sepedonicum, besitzt in seinem kulturellen Verhalten viel Aehnlichkeit mit Bact. michiganense, dem Erreger der Tomatenwelke, bildet aber auf den üblichen Nährböden farblose Kolonien, während Bact. michiganense stets schwach gelblich bis kadmiumgelb wächst. Das Entwicklungsoptimum für Bact. sepedonicum liegt deutlich niedriger als das aller anderen bis jetzt bekannten Pflanzenparasiten einschließlich Bact. michiganense, und zwar zwischen 20 und 23° C. Da Bact. sepedonicum stark zur Teratologie

neigt und auch höhere Temperaturen diese auslösen, so entstehen z. B. bei 31° aus den etwa 0,8—1 μ langen und 0,3—0,4 μ dicken Stäbchen Kugelformen bis 2,5 μ Durchmesser, die gerade für diese Bakterienspezies typisch sind. Wird Ammonsulfat (3-proz.) als Stickstoffquelle verabfolgt, so entstehen Fadenformen mit terminalen Anschwellungen (40).

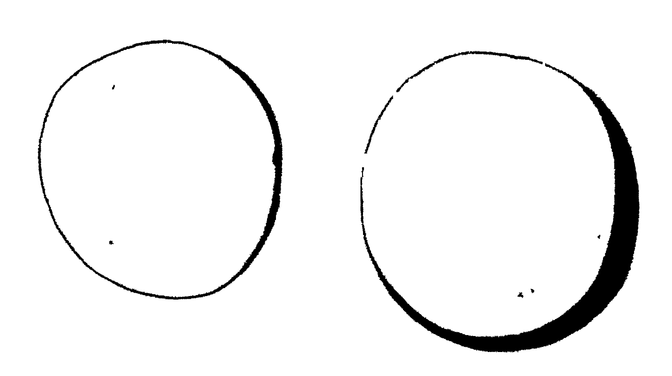


Abb. 7. „Ringfäule“ der Kartoffel; Erreger: Bact. sepedonicum. Rechts sehr stark, links mäßig stark erkrankte Knolle. Etwa $^2/_3$ natürlicher Größe.

Als Beispiel einer K l i m a - g e b u n d e n e n K r a n k h e i t sei eine w e i t e r e T r a c h e o b a k t e r i o s e der K a r t o f f e l, die „S c h l e i m f ä u l e“, hier noch genannt. Auch bei ihr kommt es zu einer Gefäßbündelringverfärbung der Knolle, die aber infolge der Tiefdunkelbraun- oder Schwarzfärbung besonders auffällig wird (siehe Abb. 8) und außerdem zu Welkeerscheinungen des Krautes. Ihr Erreger Pseud. solanacearum hat im Gegensatz zu Bact. sepedonicum ein für pflanzenpathogene Bakterien außergewohnlich hohes Temperaturoptimum von 35 bis 37° C. Da er nur bei höheren Temperaturen wirksam wird, ist er im gemäßigten Klima nicht zu fürchten. Unter ihm günstigen Bedingungen kann er aber außerordentlich starke Schäden verursachen, zumal er nicht nur für Kartoffeln hochpathogen ist, sondern auch für Tabak und andere Solanaceen, sowie Bananen, Ricinus, Baumwolle und viele Leguminosen (35, 10).

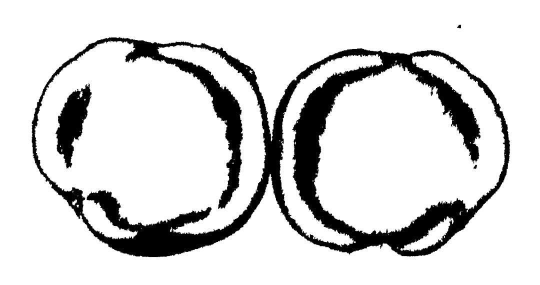


Abb. 8. „Schleimfäule“ der Kartoffel; Erreger: Bact. solanacearum.

Um Ihnen ein Beispiel für eine typische „N a ß f ä u l e“ zu zeigen, muß ich n o c h eine K a r t o f f e l b a k t e r i o s e herausgreifen, und Sie mögen gleichzeitig daraus ersehen, wie sehr die Kartoffel als Kulturpflanze allein durch parasitäre Bakterien gefährdet ist. Bei dieser Naßfäule (1, 39) kann der gesamte Knolleninhalt mit Ausnahme der „Schale“ in eine weichfaule breiige Masse verwandelt werden (siehe Abb. 9). Der Erreger, Bact. phytophthorum, hat die Fähigkeit, die Pektinsubstanzen der Mittellamellen zu lösen, wodurch das Zellgewebe in seine Einzelzellen zerfällt. Diese Einzelzellen verlieren infolgedessen ihre Turgeszenz und geben den Zellsaft nach außen ab. Im mikroskopischen Bild finden sich daher meist geschrumpfte Zellen, angefüllt mit Stärke, die er ebensowenig wie die Zellulose-lamellen anzugreifen vermag. Die Pflanze versucht, sich gegen die eindringenden Parasiten zur Wehr zu setzen. Es geschieht das durch beginnende Unterteilung von Parenchymzellen der Knolle in einer Zone, die

einige Zellreihen tiefer liegt als der Krankheitsherd. Hat die Pflanze genügend Zeit zur Peridermbildung und damit zur Einlagerung von Suberin in diese zarten Zellmembranen, so kann der Parasit nicht weiter vordringen, sondern es kommt zur „Abriegelung" des gesamten Krankheitsherdes und damit zur Gesundung der Knolle. Ist der Parasit aktiver, so unterliegt der Wirt. Wir haben es hier also zweifelsohne mit einer charakteristischen Abwehrreaktion der Pflanze zu tun. Der gleiche Naßfäuleerreger zeigt sich noch für mehrere andere Kulturpflanzen, z. B. Rüben, Karotten, Tomaten pathogen (44).

Auch zu auffallenden Quaddelbildungen kann es bei bakteriellen Infektionen an Pflanzen kommen (43). Sie entstehen z. B. bei Hyazinthen, und zwar an den weißen Zwiebelschuppen, indem der Erreger von den Leitungsbahnen aus in den zarten Parenchymzellen bis zur Epidermis vordringt. Die epidermalen Zellen vermag er aber nicht anzugreifen. Es kommt zu erheblicher Ansammlung von gelblichen Schleimmassen zwischen Epidermis und Parenchym und damit zu äußerlich erkennbaren Auftreibungen.

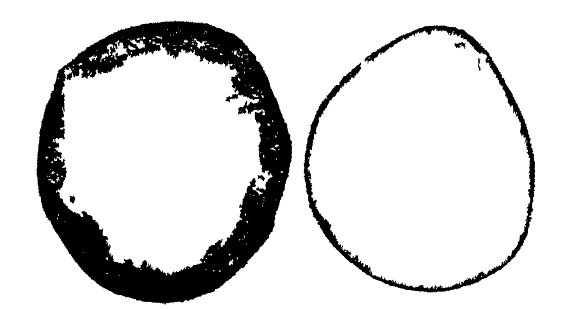


Abb. 9. „Naßfäule" der Kartoffel; Erreger: Bact. phytophthorum. Links Knollenhalfte etwa 3 Tage nach künstlicher Infektion, rechts gesunde Kontrollhälfte. Etwa $^3/_1$ natürlicher Größe.

Der Erreger dieser Gelbfäule, Pseud. hyazinthi, bildet in Bouillon längere Fäden mit zentralen kugeligen Anschwellungen.

Es seien nun einige Fleckenkrankheiten angeführt, die durch Fluoreszenten verursacht werden, und zwar zunächst die Fliederbakteriose, die eingangs genannt wurde wegen des größeren Wirtspflanzenkreises ihres Erregers, Pseud. syringae. In Deutschland tritt die Krankheit an Syringe bereits im zeitigen Frühjahr (April) im Freiland auf. Der Parasit dringt meist von der Spitze oder den Rändern der Blätter aus in die jungen zarten Frühjahrstriebe ein, diese unter Dunkelbraun- bis Schwarzfärbung in kürzester Zeit mehr oder weniger vollständig zerstörend. Derartige Melanosen sind bei parasitären Erkrankungen der Pflanzen häufig anzutreffen und werden durch Störung des Gleichgewichts der oxydo-reduktiven Vorgänge in den Wirtszellen ausgelöst. Das Auftreten dieser Fliederbakteriose setzt eine hohe relative Feuchtigkeit der Atmosphäre voraus. Mit Eintritt der Trockenheit gelangt sie sofort zum Stillstand (38).

Als nächste durch Fluoreszenten verursachte Bakteriose sei das „Wildfeuer" des Tabaks erwähnt (siehe Abb. 10), eine Blattfleckenkrankheit, die ebenfalls großen wirtschaftlichen Schaden zu verursachen imstande ist (16, 38). Keimpflanzen in einem ganz bestimmten Entwicklungsstadium zeigen die höchste Anfälligkeit; ältere und auch noch jüngere Tabakpflänzchen sind weniger anfällig (42). Der Erreger, Pseud. tabaci, ist insofern von besonderem Interesse, weil bei ihm als einem der wenigen der phytopathogenen Bakterien ein Toxinbildungsvermögen sicher nachgewiesen ist. Vermutungen, daß die Toxinbildung in Beziehung stünde zur proteolytischen Aktivität des Erregers, haben sich nach Untersuchungen von A. C. Braun (4) nicht bestätigt.

Serum: Pseudomonas tabaci (A.T.C.C.).

a) Agglutinationsversuch.

Verdünnung	Stamm					
	tabac.	C 7	C 7 reis.	12_1	17_1	24_1
1:100	++++[1]	++++	++++	++++	++++	++++
1:400	++++	++++	++++	++++	++++	++++
1:800	++++	++++	++++	++++	++++	++++
1:1000	++++	++++	++++	++++	++++	++++
1:2000	++++/+++	++++	++++	++++/+++	++++/+++	++++
1:3000	+++	+++	++++	+++/++	+++/++	++++
1:5000	++	+++	+++	++/+	++	++++/+++
1:8000	+	++	++	+	+	++
1:10000	+	++	++	(+)	(+)	++/+
1:15000	(+)	(+)	(+)	θ	(+)	+
1:20000	θ	θ	(+)	θ	θ	(+)
Kontrolle	θ	θ	θ	θ	θ	θ

Verdünnung	Stamm					
	27_1	30_3 liq.	30_3 non liq.	35_2	37_1	Dufr.
1:100	++++	++++	++++	++++	++++	++++
1:400	++++	++++	++++	++++	++++	++++
1:800	++++	++++	++++	++++	++++	++++
1:1000	++++	++++	++++	++++	++++	++++
1:2000	++++/+++	++++/+++	++++/+++	+++	++++/+++	++++/+++
1:3000	+++/++	+++/++	+++	+++/++	++	+++/++
1:5000	+++/++	+++/++	++/+	+++/++	+	++
1:8000	++	++/+	+	+	+	++
1:10000	(+)	±	(+)	(+)	(+)	(+)
1:15000	(+)	θ	θ	θ	(+)	(+)
1:20000	θ	θ	θ	θ	θ	θ
Kontrolle	θ	θ	θ	θ	θ	θ

Verdünnung	Stamm						
	angul.	Pl. K.	Am. K.	Ung. 3	Ung. 4	Ung. 6	B. fluor. liq.-Sammlung
1:100	++++	++++	++++	++++	++++	++++	θ
1:400	++++	++++	++++	++++	++++	++++	θ
1:800	++++	++++	++++	++++	++++	++++	θ
1:1000	++++	++++	++++	++++	++++	++++	θ
1:2000	++++/+++	++++/+++	++++	++++	++++	++++	θ
1:3000	+++/++	+++/++	++++/+++	++	++++/+++	++++/+++	θ
1:5000	++	++	+++/++	++/+	+++	++	θ
1:8000	++/+	++/+	+	+	++/+	++/+	θ
1:10000	(+)	+	(+)	+	+	+	θ
1:15000	(+)	(+)	θ	(+)	(+)	θ	θ
1:20000	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ
Kontrolle	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ

b) Präzipitationsversuch.

Absolute Serummenge	Stamm																	
	tabac.	C 7	C 7 reis.	12_1	17_1	24_1	27_1	30_3 liq.	30_3 non liq.	35_2	37_1	Dufr.	angul.	Pl. K.	Am. K.	Ung. 3	Ung. 4	Ung. 6
0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,05	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,005	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	(+)	(+)	(+)	(+)
0,001	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ

Je nach der Fähigkeit des Erregers zur Toxinproduktion sind die an Tabakblättern auftretenden Flecke zuerst rein chlorotisch und werden dann von dem Zentrum ausgehend braun, oder es entstehen zentral sofort braune Flecke, die nur einen mehr oder weniger chlorotischen Hof zeigen, oder aber es bilden sich nur braune Flecke mit etwas erhabenem Rand (9).



Abb. 10. „Wildfeuer" des Tabaks; Erreger: Pseud. tabaci. Blatter in verschiedenen Stadien der Krankheit. Etwa 1/4 natürlicher Große.

Serologisch sind sämtliche bisher geprüften Stämme von Pseud. tabaci, einerlei ob sie aus Nordamerika, aus Deutschland, Frankreich, Ungarn, Rumänien oder der Türkei stammen, völlig identisch (41, 46).

Im Kaiser-Wilhelm-Institut für Züchtungsforschung in Müncheberg wurden nach einer Methode, die es gestattet, unter konstanten Bedingungen gleich mehrere 1000 Tabakpflänzchen künstlich mit Pseud. tabaci zu infizieren (42), alle erreichbaren Sorten und Herkünfte von Nicotiana tabacum, etwa 100 an der Zahl, auf Resistenz gegen Wildfeuer geprüft (32). Sie erwiesen sich bedauerlicherweise sämtlich als anfällig.

Erfolge bei Resistenzuntersuchungen wurden jedoch erzielt mit Pseud. medicaginis var. phaseolicola, dem Erreger der „Fettfleckenkrankheit" der Buschbohnen (siehe Abb. 11). Es ist das eine Bakteriose, die 1928 erstmalig in Deutschland auftrat und deren Krankheitsherde an den Früchten Fettflecken durchaus ähnlich sehen, was dadurch bedingt ist, daß die normalerweise mit Luft gefüllten Interzellularen hier mit Zellflüssigkeit angefüllt sind (54). Immun war zwar keine Buschbohnensorte gegen diesen Erreger, der ebenfalls zu den Fluoreszenten gehört; es zeigten sich aber erhebliche Anfälligkeitsverschiedenheiten und einige Sorten mit höherer Resistenz konnten gefunden werden (53). Eine bewußte Züchtung von Bohnensorten mit wirt-



Abb. 11. „Fettfleckenkrankheit" der Bohne; Erreger: Pseud. medicaginis var. phaseolicola. Die beiden linken Bohnenfrüchte durch Einstich, die rechte Frucht durch Bepinseln mit Bakterienaufschwemmung infiziert. Etwa 1/2 natürlicher Größe.

1) Erklärung zu nebenstehender Tabelle. Es bedeutet: (+) = Sehr schwache, + = schwache, ++ = mäßig starke, +++ = starke und ++++ = sehr starke Agglutination.

schaftlich besonders hochwertigen Eigenschaften, in die die Fettfleckenkrankheitsresistenz eingekreuzt werden soll, ist eingeleitet worden. Vereinzelt soll die Durchführung bereits zufriedenstellend verlaufen sein.

Der Fettfleckenkrankheit ähnelt in gewissen Symptomen der „bakterielle Stengelbrand" der Erbse. Dieser trat in Deutschland plötzlich an einem Bastard im Sommer 1934 erstmalig auf, dessen Eltern völlig gesund waren (48). Der Erreger, Pseud. pisi, ruft an den Früchten zwar meist nicht in der Form, aber im Aussehen ähnliche Symptome hervor wie Pseud. medicaginis var. phaseolicola, während die Stengel erkrankter Pflanzen ein glasiges und häufig melanotisches Aussehen zeigen (siehe Abb. 12).

Zu erwähnen ist noch, daß bei den letztgenannten Krankheiten durch Fluoreszenten häufig vom Krankheitsherd nach außen Bakterienschleim, manchmal in Form von Tröpfchen, abgeschieden wird und diese Bakterienmassen vielfach die Ursache ernstester Infektionen der Nachbarbestände sind.



Abb. 12. „Bakterieller Stengelbrand" der Erbse; Erreger: Pseudomonas pisi.

Nicht alle bakteriellen Pflanzenparasiten bewirken mehr oder weniger starke Zell- oder Gewebszerstörungen, es gibt auch solche, die die Wirtspflanze zu abnormen Zellteilungen und -vermehrungen anregen, also eine pathologische Stimulation auslösen. Lokale Wucherungen recht beträchtlicher Größe können die Folge sein. Pseud. tumefaciens, der Erreger des sog. Pflanzenkrebses, ist z. B. ein derartiger Parasit. Er kommt in allen Obst- und Weinbau-treibenden Ländern der Welt vor und tritt nicht nur an Obstgehölzen (siehe Abb. 13) und Reben auf, sondern besitzt einen ungewöhnlich großen Wirtspflanzenkreis (siehe Abb. 14). Ich wies ihn neuerdings sogar bei Asparagus sprengeri, dem bekannten Zierspargel, nach (49). An Zuckerrüben (siehe Abb. 15) können die Tumefaciens-Wucherungen größer werden als die Rübe selbst (38). An Apfel-, Birn- und Quittenbäumen erreichen sie Kinderkopfgröße gar nicht selten. Die Aufmerksamkeit weiterer Kreise wurde auf diese pflanzlichen Geschwülste gelenkt, weil in ihnen manche Uebereinstimmungen mit menschlichen und tierischen Tumoren gesehen wurden (12, 3, 37, 22) und weil gelegentlich die Isolierung gleicher oder Pseud. tumefaciens-ähnlicher Bakterien auch aus Karzinomen und Sarkomen gelungen sein sollte. Das Interesse stieg noch, als aus stark ans Okkulte grenzenden Experimenten mit pflanzlichen Geschwülsten Folgerungen gezogen wurden bezüglich der Heilung maligner Tumoren bei Menschen (19, 20, 52) und weiterhin der angebliche Nachweis erbracht wurde, Pseud. tumefaciens besitze ein filtrierbares Stadium (23). In beiden Fällen ließen sich die Angaben durch exakte Nachprüfung widerlegen. Daß Pseud. tumefaciens überhaupt nicht als Ursache maligner Ge-



Abb. 13. „Wurzelkropf" an jungem Kernobstbaum. Etwa $^1/_2$ natürlicher Größe.

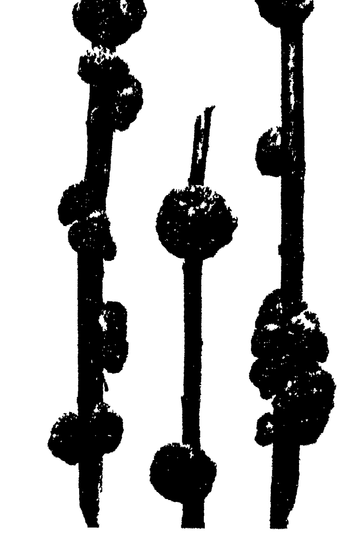


Abb. 14. „Wurzelkropf" an Weidenruten. Etwa $^1/_2$ natürlicher Größe.

schwülste bei Mensch und Säugetier in Frage kommen kann, mag daraus erhellen, daß das Temperaturmaximum dieses Bakteriums schon bei etwa + 37° C liegt. Ueber den Erreger selbst sei noch gesagt, daß er ein Wundparasit ist und einen eigentümlichen Entwicklungszyklus durchläuft unter vorübergehender Bildung sog. „Sterne", die dann wieder in Einzelzellen zerfallen. Ueber die Bedeutung dieser „Sternbildung" kann Endgültiges noch nicht ausgesagt werden (51). Sie ist unabhängig von der Virulenz des jeweiligen Stammes. Im serologischen Verhalten der Stämme verschiedener Herkünfte zeigen sich bei Pseud. tumefaciens Verschiedenheiten. Andererseits besitzen aber auch Stämme, die serologisch völlig identisch sind, ein unterschiedliches Verhalten in ihrer Pathogenität gegenüber bestimmten Wirtspflanzen. Wir haben es hier wahrscheinlich mit „physiologischen Rassen" zu tun, wie wir solche z. B. bei den Rostpilzen und der Phytophthora infestans kennen (49).



Abb. 15. „Wurzelkropf" der Zuckerrübe; Erreger: Pseud. tumefaciens. Etwa $^1/_4$ natürlicher Größe.

Auf die mit allen sonstigen bakteriologischen Erfahrungen im Widerspruch stehende Tatsache, daß fast sämtliche aus kräftig wachsenden Spontantumoren holziger Pflanzen isolierten Stämme von Pseud. tumefaciens apathogen sind, hatte ich bereits vor Jahren hingewiesen (37). Wir (55) haben versucht, dieses sonderbare Verhalten zu ergründen und konnten mit wässerigen Auszügen aus bestimmten Zonen solcher Tumoren eine Virulenzschwächung, zuweilen sogar Virulenzverlust erzielen.

Virulenzverlust läßt sich auf künstlichen Substraten auch erreichen durch Glyzin, Alanin, Glyzylglyzin und bis zu gewissem Grade auch Dizyandiamid (26, 55, 31). Diese Stoffe wirken aber alle wesentlich langsamer als frische Tumorauszuge, so daß nicht gefolgert werden kann, einer dieser Stoffe sei etwa als der im Tumorextrakt hinsichtlich der Virulenzeinbuße wirksame anzusehen.

Ueber die Art und Weise der Geschwulstentstehung liegen von E. F. Smith genauere seither unbestrittene Angaben vor. Danach beginnt eine bestimmte Einzelzelle, meist eine Parenchymzelle der Rinde, zunächst anzuschwellen und sich dann vielfach zu unterteilen, wobei mehr als 100 Tochterzellen innerhalb der Mutterzelle entstehen sollen. Erst dann beginnen nach Smith die Tochterzellen zu wachsen und die Nachbarzellen zu Tumorzellen zu werden (47). Nach neuesten Untersuchungen von Dame (8) begann die Unterteilung selbst bei Verletzung und Infektion nur einer einzigen Zelle (Epidermishaar bei Tomate) niemals nur in einer, sondern stets ziemlich gleichzeitig in mehreren benachbarten Zellen. Dasselbe war im Gegensatz zu den Angaben von Smith auch bei gröberen Verletzungen mehrerer Zellschichten zu beobachten. In Uebereinstimmung mit diesem konnte aber festgestellt werden, daß die zunächst hyperplastisch werdenden Krebszellen zum Unterschied von den Zellen des normalen Wundkallus sich völlig unregelmäßig unterteilten und auch ihrer Polarität verlustig gegangen waren.

Der Frage, welcher Faktor es wohl sein mag, der das Krebsbakterium befähigt, die Wirtszellen zu ungehemmter Teilung anzuregen, ist schon früh besonderes Interesse entgegengebracht worden. Die Vermutung, daß es Stoffwechselprodukte des Erregers sein müßten, die hierfür verantwortlich zu machen seien, lag natürlich nahe. Es ist auch im Laufe der Jahre eine große Reihe derartiger Stoffe geprüft worden. Mit manchen war es zwar möglich, eine Zellproliferation in bescheidenem Umfang zu erzielen, doch erst 1936 gelang es den Amerikanern Brown und Gardner (5) im Heteroauxin, also der β-Indolylessigsäure, jenen Stoff zu finden, der, in Lanolinpaste auf Wunden aufgetragen, Tumoren von ansehnlicher Größe entstehen ließ. Aehnlich wie die β-Indolylessigsäure wirkte die β-Indolylpropionsäure. Die ersten Untersuchungsergebnisse fanden bald Bestätigung und wichtige Ergänzungen (18, 36, 24, 8, 30, 25). Auch die β-Indolylbuttersäure erwies sich als brauchbar. Ferner gelang es durch entsprechende Aetherextraktion aus Reinkulturen von Pseud. tumefaciens und auch aus Tumorgewebe Hormone zu isolieren, die in ihrer Wirkung dem Heteroauxin gleichkamen. Zusatz von Tryptophan zum Peptonnährboden bei der Kultivierung des Erregers förderte die Bildung von Wuchsstoffen. Es ist also durchaus möglich, daß wir im Tryptophan die Muttersubstanz erblicken können, aus der der bakterielle Erreger vermutlich durch oxydative Desaminierung (56) die Wuchshormone bildet, bei denen es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um niedere β-Indolylfettsäuren handelt. Nur pathogene Stämme bilden nach Dame den Wuchsstoff, apathogene sind dazu nicht in der Lage. Es ist das meines Wissens der erste Fall in der Phytopathologie, in dem man das Vorhandensein bzw. den Verlust der Pathogenität bei Bakterienstämmen derselben Spezies rein chemisch kontrollieren kann.

Ueber die karyologischen Verhältnisse in den pflanzlichen Krebszellen herrscht ebenfalls noch keine völlige Klarheit. Sicher ist bisher nur, daß Mehrkernigkeit und Polyploidie vorkommen (21, 58, 15, 14).

Zu der Frage des Auftretens von Sekundärtumoren führte ich früher schon aus (37, 47, 46), daß diese nicht den Metastasen gleichgesetzt werden dürfen, weil wir ihren Ursprung nicht versprengten „Krebszellen" des Wirtes zu verdanken haben, sondern Bakterien, die vom Infektionsherd aus dorthin „abgewandert"[1]) sind. So traten an Pelargonium zonale in unseren letztjährigen Versuchen wieder spontan Sekundärtumoren auf (s. Abb. 16). Es war auch hierbei kenntlich, daß unvollständige Vernarbungen der Blattansatzstellen (also Wunden) für die Entstehung derselben mitverantwortlich gemacht werden mußten. Neuerdings wird aber von amerikanischer Seite (5a) über Beobachtungen berichtet, nach denen Sekundärtumoren auch bei Pflanzen aufgetreten sind, deren Primärtumoren nur durch β-Indolylessigsäure hervorgerufen waren. Die Bestätigung dieses außerordentlich interessanten Befundes bleibt abzuwarten.

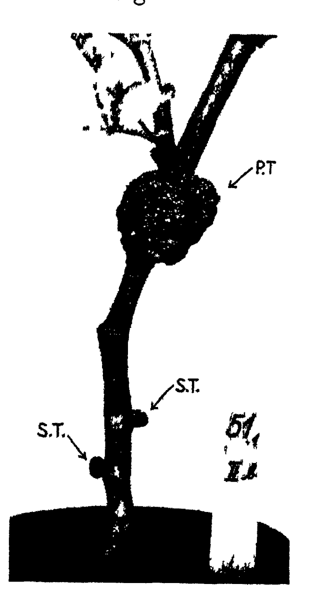


Abb. 16. Pelargonie mit oberem, nach künstlicher Impfung mit Pseudomonas tumefaciens entstandenem Primärtumor und unteren später entstandenen Sekundärtumoren. Etwa $^1/_2$ natürlicher Größe.

In einem Bericht über pflanzliche Krankheiten wird man mit Recht auch einen Hinweis auf die Möglichkeiten der Bekämpfung erwarten. Mit innertherapeutischer Behandlung bereits parasitär erkrankter Pflanzen ist man in der Phytopathologie über bescheidenste Anfänge bisher noch nicht hinausgekommen. Im Erfolgsfall wird sie, sofern nicht eine unveränderte Aufnahme des Therapeutikums vom Boden aus durch die Wurzeln möglich ist, nur in Ausnahmefällen Anwendung finden können, z. B. bei Bäumen und vielleicht bei besonders wertvollen Ziergewächsen, denn das pflanzliche Einzelindividuum wird im allgemeinen nicht nach einem ideellen, sondern nach seinem reellen Wert eingeschätzt. Chirurgische Eingriffe sind unter Umständen möglich bei Lokalerkrankungen, dürften aber aus dem gleichen Grunde wie zuvor nur in beschränktem Maße in Frage kommen. Das erstrebenswerteste Ziel vom landwirtschaftlichen, gärtnerischen und forstlichen Gesichtspunkt aus besteht in der Heranzucht krankheitswiderstandsfähiger Kultursorten, entweder durch Selektion oder auf dem Wege über die Kreuzungszüchtung. Daß auf diesem Gebiet bereits erfolgversprechend gearbeitet wird, darauf wies ich schon hin. Nicht immer wird das Ziel sich erreichen lassen; auch das deutete ich bereits an. Es bleiben dann als wichtigste Maßnahmen solche der Vorbeugung bzw. Verhütung.

Hier wären zu nennen: Verwendung nur gesunden Saatgutes, Berücksichtigung der ökologischen Verhältnisse beim Anbau sowie der jeweils geeigneten Saat- oder Pflanzzeit, richtige Ernährung unter Vermeidung reichlicher Stickstoffgaben, sofortige Entfernung erkrankter Einzelpflanzen aus

1) Neueste Untersuchungen (55) an einer hierfür besonders geeigneten Testpflanze, der Datura tatula, erbrachten den sicheren Beweis, daß Pseud. tumefaciens unter optimalen Bedingungen sich in einigen Wochen bis auf Entfernungen von 120 cm vom Infektionsherd aus in der Wirtspflanze verbreiten kann.

dem Bestand, Schutz der gesunden Pflanzen oder gefährdeter Teile derselben durch Tauchung oder Bespritzung mit Desinfizientien, die den Wirt nicht schädigen, Bodenentseuchung u. dgl. mehr. —

Meine Ausführungen werden Ihnen eine Bestätigung dafür sein, daß infolge der großen Verschiedenheiten zwischen Pflanze und Tier bzw. Mensch als Parasitenträger sich auch Infektionsart, Krankheitsform und -verlauf meist stark abweichend verhalten. Im übrigen dürften sie aber auch gezeigt haben, daß gerade auf diesem speziellen Arbeitsgebiet eine ganze Anzahl von Berührungspunkten mit der medizinischen Wissenschaft vorliegt. Im Hinblick auf diese sei mir gestattet, dem Wunsche Ausdruck zu verleihen, daß die neuerdings angebahnte engere Fühlungnahme zwischen den Vertretern der naturwissenschaftlichen und medizinischen Disziplinen sich in Zukunft noch vertiefen möchte, zum Nutzen beider Forschungszweige.

Schrifttum.

1) Appel, O., Arb. Biol. Abtlg. ksl. Gesdh.amt **3**, 364 (1903). — 2) Arkwright, J. of Path. **24**, 36 (1921). — 3) Blumenthal, F., Festschr. z. 25jährigen Bestehen des Universitätsinstituts für Krebsforschung an der Charité, am 8. Juni 1928, S. 42. — 4) Braun, A. C., Zbl. Bakter. II **97**, 177 (1937). — 5) Brown, N. A., u. Gardner, F. E., Phytopathology **26**, 708 (1936). — 5a) Dies., Ebenda **27**, 1110 (1937). — 6) Burkholder, W. H., Phytopathology **28**, 935 (1938). — 7) Burrill, T. J., Trans. Illinois State Hort. Soc. **12**, 77 (1879). — 8) Dame, F., Zbl. Bakter. II **98**, 385 (1938). — 9) Dufrénoy, J., Phytopathology **27**, 792 (1937). — 10) Elliott, Ch., Manual of bacterial plant pathogens. Baltimore 1930. — 11) Gäumann, E., Schweiz. med. Wschr. **67**, 1937, 10 S. (Sonderdruck). — 12) Kauffmann, F., Z. Krebsforschg **24**, 260 (1927). — 13) Kordes, H., Die Gartenbauwissenschaft **11**, 231 (1937). — 14) Kostoff, D., Protoplasma **20**, 440 (1934). — 15) Ders., u. Kendall, J., Arch. f. Mikrobiol. **4**, 487 (1933). — 16) Kotte, W., Dtsch. landw. Presse **54**, 714 (1927). — 17) Ders., Z. Pflanzenkrkh. **40**, 51 (1930). — 18) Kraus, E. J., Brown, N. A., a. Hammer, K. C., Bot. Gaz. **98**, 370 (1936). — 19) Lakhovsky, G., L'origine de la vie. Paris 1926. — 20) Ders., Das Geheimnis des Lebens. München 1931, 264 S. — 21) Levine, M., Phytopathology **19**, 97 (1929). — 22) Ders., Botanical Review, Lancaster **2**, 439 (1936). — 23) Lieske, R., Zbl. Bakter. I Orig. **108**, 118 (1928). — 23a) Ders., ebenda **111**, 419 (1929). — 24) Link, G. K. K., Wilcox, H. W., u. Link, A. D. S., Bot. Gaz. **98**, 816 (1937). — 25) Locke, S. B., Riker, A. J., a. Dugger, B. M., J. agricult. Res. **62**, 21 (1938). — 26) Longley, B. J., Berge, T. O., van Lanen, J. M., a. Baldwin, J. L., J. Bacter. **33**, 28 (1937). — 27) McLean, F. T., Bull. Torrey Bot. Club **48**, 101 (1921). — 28) Ders., a. Lee, H. A., Phytopathology **11**, 109 (1921). — 29) Orth, H., Zbl. Bakter. II **96**, 376 (1937). — 30) Riker, A. J., a. Nagy, R., Phytopathology **28**, 18 (1938). — 31) Riker, A. J., van Lanen, J., a. Baldwin, J. L., Phytopathology **28**, 19 (1938). — 32) Schmidt, M., Der Züchter. 7. Jahrg., 208, (1935). — 33) Scholtens, R. Th., Zbl. Bakter. I Orig. **139**, 467 (1937). — 34) Smith, E. F., Bacteria in relation to plant diseases. Washington, D. C. **1** (1905), **2** (1911), **3** (1914). — 35) Ders., An introduction to bacterial diseases of plants. Philadelphia a. London 1920. — 36) Solacolu, Th., et Constantinesco, D., C. r. Acad. Sci., Paris **204**, 290 (1937). — 37) Stapp, C., Ber. Dtsch. Bot. Ges. **45**, 480 (1927). — 38) Ders. Schizomycetes (Spaltpilze oder Bakterien), i. Sorauer, Handb. d. Pflanzenkrankh., 5. Aufl. **2**, 1928. — 39) Ders., Arb. Biol. Reichsanst. Land- u. Forstwirtsch. **16**, 643 (1928). — 40) Ders., Z. Parasitenkde **2**, 756 (1930). — 41) Ders., Angew. Bot. **12**, 241 (1930). — 42) Ders., Ebenda **15**, 225 (1933). — 43) Ders., Arb. Biol. Reichsanst. Land- u. Forstwirtsch. **20**, 309 (1933). — 44) Ders., Zbl. Bakter. II **88**, 459 (1933). — 45) Ders., Ebenda **90**, 320 (1934). — 46) Ders., Botanical Review, Lancaster **1**, 405 (1937). — 47) Ders., i. Adam-Auler, Neuere Ergebnisse auf dem Gebiete der Krebskrankheiten. Leipzig, S. Hirzel, 1937 S. 168ff. — 48) Ders., Zbl. Bakter. II **96**, 1 (1937). — 49) Ders., Ebenda **99**, 116 (1938). — 50) Ders., Arb. Biol. Reichsanst. Land- u. Forstwirtsch. **22**, 379 (1938). — 51) Ders., u. Bortels, H., Z. Parasitenkde **4**, 101 (1931). — 52) Dies., Zbl. Bakter. II **88**, 313 (1933). — 53) Stapp, C., u. Hähne, H., Angew. Bot. **18**, 249 (1936). — 54) Stapp, C., u. Kotte, W., Nachr.bl. Dtsch. Pflanzenschutzdienst **9**, 35 (1929). — 55) Stapp, C., u. Müller, H., Zbl. Bakter. II **99**, 210 (1938). — 56) Thimann, K. V., J. of biol. Chem. **109**, 279 (1935). — 57) Wilhelm, A. F., Nachr.bl. Dtsch. Pflanzenschutzdienst **16**, 58 (1936). — 58) Winge, Ö. Z. Zellforschg **10**, 683 (1930).

Aussprache.

J. P. Bijl und Prof. Dr. E. van Slogteren (Utrecht): **Serologische Untersuchung bei Narzissen, welche an einer Viruskrankheit leiden.**

Die Untersuchungen von Gratia, Chester u. a. haben erwiesen, daß der Saft einer an Viruskrankheit leidenden Pflanze Antigene enthalten kann, welche mit dem Antiserum eine Prazipitationsreaktion geben konnen.

Es fragt sich jetzt, ob auch die Viruskrankheit, welche sich bei den Narzissen durch grauen Streifen auf den Blättern zeigt, serologisch zu diagnostizieren ist. Experimentell kann man die Krankheit übertragen durch Infektion der Blätter einer gesunden Pflanze mit dem Saft einer kranken. Die infizierte Pflanze wird selber nicht sofort krank; erst um ein Jahr später kann man bei der neuen Pflanze die Symptome feststellen.

Die Untersuchungen sind gemacht worden mit Narzissen der Varietät Sir Watkin.

Die Bereitung des Antigens.

Frische Blätter werden geschnitten und dann zwischen Filz in einer hydraulischen Presse unter einem Druck von $\pm$ 5000 kg pro qcm ausgepreßt. Der Saft enthält einige Fasern, ist aber im übrigen klar.

Die Bereitung des Antiserums.

Kaninchen werden alle zwei Tage intravenös 6 ccm des frisch bereiteten und zentrifugierten Saftes eingespritzt. Nach 6—15 Einspritzungen wird Blut entnommen.

Von den 12 Kaninchen, in dieser Weise behandelt, ist eines unter anaphylaktischen Symptomen gestorben.

Ausführung der Reaktion.

Weil der Saft gesunder wie kranker Pflanzen nach einigen Stunden trübe wird, zentrifugiert man den trübe gewordenen Saft bevor man damit zu reagieren anfangt. Der unverdünnte Saft wird in einem „Wassermannröhrchen" mit unverdünntem Serum gemischt und 2 Std. bei 37° und danach nochmals 2 Std. bei Zimmertemperatur gehalten. Weil manchmal auch der zentrifugierte Saft bei 37° eine Präzipitation gibt, ist eine Kontrolle mit Saft ohne Serumzusatz unbedingt notig.

Ergebnis.

Das Serum dreier Kaninchen, eingespritzt mit dem Saft kranker Sir Watkins, gab mit gesundem wie mit krankem Watkinsaft eine Präzipitation.

Nebenbei sei bemerkt, daß die Sera vor der Einspritzung keine Reaktion gaben.

Aus dem Ergebnis dieser positiven Reaktionen ist zu schließen, daß der Saft von kranken sowohl wie von gesunden Watkins ein und dasselbe Antigen enthält der gesunden Pflanze gehorend.

Es fragt sich jetzt, ob in dem Saft der kranken Pflanzen neben dem normalen Antigen auch ein Virusantigen nachzuweisen ist. Die Frage, ob dieses Antigen das Virus selbst ist oder der pathologisch geanderte Saft, lassen wir hier unberührt.

Um dies zu untersuchen, haben wir die Sera mit der 3—5fachen Menge gesunden Saftes zusammengebracht. Nachdem sich ein deutliches Präzipitat geformt hatte, wurde dasselbe abzentrifugiert. Von der klaren Flüssigkeit wurde 1 ccm mit 1 ccm gesundem Saft gemischt. Es entstand kein Präzipitat; man kann also schließen, daß die Sera von den gegen normalen Saft gerichteten Antistoffen befreit waren.

Die in dieser Weise behandelten Sera wurden darauf auf die Anwesenheit von gegen kranken Saft gerichteten Antistoffen untersucht, indem man 1 ccm mit 1 ccm kranken Saftes zusammenbrachte. Es ergab sich, daß die Sera der mit normalem Saft eingespritzten Kaninchen kein oder ein sehr geringes Präzipitat gaben, während 2 Sera der 3, mit krankem Saft eingespritzten Kaninchen ein starkes Präzipitat mit krankem Saft entstehen ließen, und das sich vom dritten ein nicht starkes, aber trotzdem deutliches Präzipitat ergab. Die stark wirkenden Antisera gaben immer ein viel deutlicheres Präzipitat mit krankem Saft als mit gesundem.

Hieraus ergibt sich, daß der Saft kranker Sir Watkins ein Antigen enthält, welches nicht in den gesunden Sir Watkin-Narzissen anwesend ist.

In der Folge haben wir Kaninchen kranken Saft, auf verschiedene Art vorbehandelt, eingespritzt. Die besten Ergebnisse hat man jedoch durch Injektionen mit frischem Saft erhalten.

Es fragt sich, ob die gegen kranken Saft der Sir Watkin-Varietaten gerichteten Antistoffe auch mit dem kranken Saft anderer Narzissenvarietaten reagieren. Dazu wurden die Varietäten Croesus, Minister Talma, Mrs Krelage, van Waverens Giant, doppelt von Sion, King Alfred untersucht.

Den Saft dieser Pflanzen untersuchte man immer mit gegen kranken Watkinsaft gerichteten Antisera.

Das Ergebnis war folgendes:

Kontrolle Sir Watkin: krank, immer stark positiv;
gesund, negativ;
keine spontane Ausflockung.

Reaktion mit Croesus: krank, stark positiv;
gesund, schwach positiv oder negativ;
gesund, spontan schwach positiv, wenn Reaktion positiv.

Reaktion van Waverens Giant: krank, stark positiv;
gesund, schwach positiv;
spontan schwach positiv.

Reaktion King Alfred: krank, stark positiv;
gesund negativ;
silberbunt, negativ.

Reaktion Min. Talma: krank negativ;
gesund negativ.

Reaktion doppelt v. Sion: mosaik krank negativ;
gesund negativ.

Reaktion Mrs. Krelage: krank negativ;
gesund, schwach positiv;
spontan schwach positiv.

Bei später gemachten Proben reagierten die kranken Säfte stärker als die gesunden.

Aus den Versuchen zeigte sich also, daß das gegen kranken Watkinsaft gerichtete Serum zusammen mit krankem Saft einiger anderen Varietäten gleichfalls ein Präzipitat gab. Es gab aber kein Präzipitat mit dem Saft einer silberbunten King Alfred, mit dem einer grauen Min. Talma und auch nicht mit dem Saft einer mosaikkranken doppelt v. Sion-Varietät. Dies würde möglicherweise darauf hinweisen können, daß bei grauen Sir Watkins ein anderes Virus die Krankheit verursacht als bei den silberbunten King Alfred der mosaikkranken Sion- und der grauen Min. Talma-Varietät.

Zusammenfassung.

Viruskranke Sir Watkin-Narzissen kann man durch serologische Reaktionen von gesunden unterscheiden.

Auch bei grauen Exemplaren mancher anderen Varietäten kann man durch serologische Reaktionen das Virus der grauen Sir Watkin nachweisen.

Die serologischen Reaktionen konnten möglicherweise darauf hinweisen, daß bei silberbunten King Alfreds, bei mosaikkranken Sions und bei grauen Min. Talmas ein anderes Virus die Krankheit verursacht hat als bei der grauen Sir Watkins.

Dold (Freiburg/Br.):

Im Rahmen unserer Studien über antibakterielle Hemmungstoffe (Inhibine) haben wir uns auch mit der Frage beschäftigt, wie sich die Pflanze vor dem Wachstum der in das Innere der Pflanze gelangenden mikrobiotischen Lebewesen zu schützen vermag. Unsere Versuche betrafen hauptsächlich die Kartoffel. Wir konnten zeigen, daß die Kartoffel z. B. gegen B. prodigiosum, B. pyocyaneus, Staph. pyogenes aureus, durch Stoffe, die durch die übliche Sterilisierungstemperatur und -dauer unwirksam gemacht werden, geschützt ist. Der wirksame Faktor ist, wie gemeinsam mit Remy durchgeführte Untersuchungen zeigten, in der Hauptsache in einem gelblichen, fettähnlichen Anteil vorhanden, den man erhält, wenn man den unter hohem Druck gewonnenen Preßsaft der Kartoffel lange und scharf zentrifugiert. Die antibakterielle Wirkung dieser so gewonnenen Wirkstoffe (ebenso wie

die ähnliche Wirkung von Karotinen) ist mehr oder weniger spezifisch, d. h. sie ist nur gegenüber gewissen Bakterien vorhanden, z. B. gegenüber B. anthracis, und fehlt gegenüber anderen Bakterien (z. B. gegenüber B. coli und B. typhi). Die Ausführungen wurden durch Lichtbilder erläutert.

14. C. Gorini (Mailand):

Enzymatische Bakteriengruppierung.

Wenn ich ein solches allgemeines Thema anzugreifen wage, ist es deswegen, weil meine umfassenden, wenn auch bescheidenen biologischen und biochemischen, medizinischen und zymotechnischen, theoretischen und praktischen Kenntnisse mich hoffen lassen, es mit genügender Vielseitigkeit und Vollständigkeit zu behandeln. Die Frage ist ganz modern und im vollen Fluß. Ich möchte sie gern breit berücksichtigen, aber wegen der Zeitbeschränkung werde ich mich begnügen, sie per summa capita durchzuschauen. Mein Ziel ist die Wichtigkeit der Bakterienenzymlehre nicht nur für die reine, sondern auch für die angewandte Wissenschaft, nicht nur für die Zymotechnik, sondern auch für die Medizin emporzuheben.

Ich spreche von Bakteriengruppierung, nicht von Klassifikation; denn die Klassifikation erfordert systematische und taxonomische Regeln, mit welchen ich mich nicht beschäftigen will. Die enzymatische Gruppierung bekümmert sich weder um die Morphologie noch um die Nomenklatur der Bakterien. Jede Gruppe kann jedwelche Form mit jedwelchem Appellativ enthalten, ohne Berücksichtigung der Synonymen, der Impartialität, der Einheitlichkeit. Man kann verschiedene enzymatische Gruppierungen machen; aber die wichtigste scheint mir diejenige, welche die zwei metabolischen Hauptfunktionen betrachtet: die Saccharolyse und die Proteolyse. Diese enzymatische Gruppierung hat ihren Ursprung in der Entdeckung der Azidoproteolyten vor fast 50 Jahren, welche mich dazu geleitet hatte, drei Gruppen von Milchbakterien festzustellen: die gemeinen Milchsäurebakterien, die gemeinen peptonisierenden Bakterien und die säurelabbildenden Bakterien. Diese letzten wurden später (nach der glücklichen Grimmerschen Initiative) Azidoproteolyten genannt, weil die Labwirkung schon eine Proteolyse ist und übrigens die meisten Azidoproteolyten das Gerinnsel bei saurer Reaktion weiter auflösen. Nur enzymologisch ungeschulte Forscher könnten säurelabbildende und säureproteolytische Bakterien auseinanderreißen. Auf diese Weise habe ich schon längst (wie Oppenheimer schreibt) die bis vor kurzem allgemeine Annahme einer einfachen Tryptasebildung bei Bakterien erschüttert.

Wegen der Präkozität dieser Forschungsergebnisse gegenüber der damaligen Epoche blieben sie während langer Zeit unberücksichtigt, vernachlässigt, wahrscheinlich auch deswegen, weil die ersten von mir nachgewiesenen Azidoproteolyten banalen Arten zugehörten. Erst zehn Jahre später, nachdem ich nach und nach Azidoproteolyten unter milchwirtschaftlichen und anderen saprophytischen wichtigen Bakterien und, namentlich durch besondere Zuchtvorrichtungen (Milchaufagarkultur), selbst unter parasitischen und pathogenen Bakterien nachgewiesen hatte, welche bis dahin als nicht proteolytisch bekannt waren (B. typhi — coli, Streptokokken usw.) fing man an,

allmählich meine Untersuchungen und Vorschläge zu beachten. Und heutzutage kommt der obigen Einteilung in allen, sowohl zymotechnischen als medizinischen Gebieten eine Bedeutung zu. Selbstverständlich handelt es sich um keine absolute Unterscheidung — wo gibt es in der Biologie absolute Definitionen? —, denn es ist ja anzunehmen, daß sämtliche Bakterien enzymatische Fähigkeiten besitzen, um ternäre und quaternäre organische Stoffe zur Ernährung zu benutzen. Sie mögen sicher nicht exklusivistisch in ihren Bedürfnissen sein; vielmehr habe ich Enzymbildung wahrgenommen, die unabhängig vom Bedürfnis war; z. B. Chymasebildung beim B. prodigiosum selbst in kaseinfreien Nährböden (1892). Aber als man konstatierte, daß ceteris paribus ein Bakterium die genuine (nicht zugesetzte) Milch säuerte und gerinnt, ohne das Gerinnsel aufzulösen, ein zweites Bakterium sie ohne Säuerung und oft mit Alkalisierung peptonisiert und ein drittes sie säuert und gleichzeitig peptonisiert, muß man unbedingt daraus schließen, daß die drei Mikroben verschiedene und nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ verschiedene enzymatische Eigenschaften besitzen.

In der Tat, die Verschiedenheit der Enzymbildung bei den Bakterien kann auf der Quantität oder auf der Qualität der Enzyme beruhen. In bezug auf die Quantität darf man denken, daß beim ersten Bakterium das saccharolytische gegenüber dem proteolytischen Vermögen überwiegend ist, beim zweiten umgekehrt und beim dritten die zwei Vermögen annähernd gleich stark sind. In bezug auf die Qualität muß man aber mindestens drei Gesichtspunkte berücksichtigen: Anzahl, Sensibilität und Abgabe der Enzyme. Betreffs der Anzahl hat man nunmehr eine Reihe von Karbohydrasen und Proteasen kennengelernt, so daß man lieber von Enzymsystemen als von einzelnen Enzymen spricht; betreffend die Sensibilität weist man nach, daß die Enzyme gegenüber den Förderungs- und Hemmungsfaktoren sich verschieden verhalten, so daß ihre Aktivität mehr oder weniger Hilfsstoffe bedarf; betreffend die Abgabe brauche ich bloß an die Verschiedenheit zwischen Endo- und Ektoenzymen oder, besser, zwischen Desmo- und Lyoenzymen, und überdies an die verschiedene Geschwindigkeit der bakteriellen Autolyse zu erinnern.

Demzufolge, innerhalb der obengenannten Beschränkungen — bitte noch einmal nicht zu vergessen, daß die Biologie keineswegs scharf abgegrenzte Gruppen gestattet —, bleibt stets die enzymatische Einteilung in drei Gruppen einzuhalten, welche man verallgemeinern kann unter den Namen: Glykolyten, Proteolyten und Glykoproteolyten, die man aber besser immer Azidoproteolyte nennen muß, um sie von anderen Bakterien (wie denen der Proteus- und Heubazillengruppe) zu unterscheiden, welche manchmal auch Zucker und Eiweiß, aber dieses nicht bei saurer Reaktion, spalten können. Allerdings muß man erwähnen, daß die Einreihung einzelner Bakterien zu jeder Gruppe nicht für alle Fälle endgültig sein darf.

Selbstverständlich muß man die Abhängigkeit der biochemischen Wirkungen von den Umweltbedingungen in Rechnung bringen. Auch hier werden meine alten Beobachtungen durch die gegenwärtige Vervollkommnung der Enzymologie bestätigt und erklärt.

Schon frühzeitig (1897), dank dem Verhalten der Azidoproteolyten in der Milch, konnte ich darauf hindeuten, daß Saccharolyse und Proteolyse hauptsächlich durch die Lüftungs-, Temperatur- und Nahrungsverhältnisse beeinflußt sind. Was die Lüftung anbelangt, findet es seine Rechtfertigung in den heutigen wahrgenommenen Atmungsenzymsystemen und Redoxpotentialen der Mikroben; zu dieser Frage hat neulich Janke einen wertvollen Beitrag gebracht. Was die Temperatur anlangt, werden meine Ergebnisse

über die Begünstigung des Kaseinabbaues durch niedrige Temperatur bei der Entdeckung von schwach azido-kaseolytischen Typen gebraucht. Was die Nahrung anbelangt, wurden zwei von mir hervorgehobene Punkte durch die Enzymforschungen bekräftigt. Erstens: es gibt keinen Parallelismus zwischen Kaseolyse und Kollolyse in dem Sinne, daß alle gelatineverflüssigenden Bakterien die Milch peptonisieren, und umgekehrt. Gorbach und Maschmann (zwei sorgfältige Enzymforscher) haben Bakterienproteasen isoliert, welche nur Gelatine oder nur Kasein zu spalten vermögen. Dasselbe gilt bezüglich des Nichtparallelismus zwischen anderen Eiweißspaltungen (Serumeiweißabbau, Hämolyse, Fibrinolyse usw.) und zwischen den verschiedenen Karbohydratenspaltungen (Glukose — Laktose — Saccharoseabbau usw.). Zweitens: selbst die feinsten Qualitätsschwankungen der Milch üben einen bedeutenden Einfluß aus. Infolgedessen habe ich, zur Bestimmung des mikrobiellen Metabolismus in der Milch, die Anwendung von normaler Milch und nicht nur chemisch, sondern auch biochemisch normaler und unveränderter Milch, d. h. von einer nicht dysgenetischen, hygienisch gemolkenen, frischen und schonend sterilisierten Milch empfohlen. Auch das verschiedene Verhalten der drei Gruppen gegenüber der gekochten Milch findet seine Erklärung in den verschiedenen Enzymsystemen, je nachdem sie mehr Proteinasen als Peptidasen bilden. Oder umgekehrt: die proteinasenbildenden Bakterien (die Azidoproteolyten) können selbst die genuinen nativen Kaseine angreifen, die peptidasenbildenden (die gemeinen Milchsäurebakterien) nur die hydrolisierten Kaseine angreifen. Gorbach hat in der Tat unter solchen Umständen die Ursache für die oft wechselnden und zum Teil sich widersprechenden Ergebnisse gefunden. Selbstverständlich erschweren ähnliche Umstände die Untersuchungen unter konstanten Zuchtbedingungen über die Wirkung der Bakterien auf sämtliche Eiweiß- und Kohlehydratstoffe.

Deshalb kann ein und dasselbe Bakterium zu der einen oder zu der anderen Gruppe gehören, je nach dem Untersuchungsgebiet. Die milchwirtschaftliche Einteilung kann nicht immer mit der medizinischen oder anderen Einordnungen übereinstimmen. Z. B. in eigenen Untersuchungen wurde B. prodigiosum auf Grund des Verhaltens auf Nährgelatine ganz wie B. pyocyaneum als einfacher Proteolyt betrachtet. Der Milch gegenüber wurde B. prodigiosum von mir als der erste Azidoproteolyt gefunden, während B. pyocyaneum noch immer als echter Alkalinoproteolyt blieb. Die enzymatische Kontrolle läßt in der Tat einen wirklichen Unterschied zwischen diesen zwei Organismen erkennen, wie die Forschungen von Moycho, Gorbach und Maschmann bewiesen haben.

Eine andere beachtenswerte Seite des vorliegenden Themas ist durch die Frage der bakteriellen Individualität gebildet. Als erster (1921), immer dank des besonderen dazu geeigneten Verhaltens der Azidoproteolyten in der Milch, habe ich das Vorkommen von spontanen plötzlichen Mutationen durch natürliche biochemische Zellabweichungen nachgewiesen, so daß demnach die Variation zu physiologischen (nicht immer zu forcierten adaptativen) Phänomenen gehören mag. Um das Auftreten von solchen Phänomenen zu vermeiden, habe ich die Anwendung von großen Einsaaten bei den Kulturen vorgeschrieben. Ein besonderes Augenmerk auf die Notwendigkeit von großen Bakterieneinsaaten und überhaupt von großen Bakterienausgangsmengen für die enzymatischen Studien haben letzthin Wohlfeil und Schollmeyer gerichtet.

Zusammenfassend, je mehr die enzymologischen Studien über die Bakterien verbreitert und vertieft werden, um so mehr kommt es zur Feststellung von zahlreichen Enzymen, welche sich durch das Wirkungsoptimum, durch

den Wirkungsbereich, durch das Verhalten gegenüber Förderungs- und Hemmungsfaktoren, durch die Befreiung- und Zerfallsbeschleunigung usw. unterscheiden; und um so mehr entsteht die Anständigkeit der enzymatischen Gruppierung. Ein glänzendes Beispiel ist eben durch die Azidoproteolyten geboten, bei denen ich zunächst, nach den damaligen Kenntnissen, eine Pepsinase im Sinne von Wines angenommen hatte; aber sobald ich im Jahre 1931 das Bedürfnis fühlte, meine Tücher in der Isar zu waschen, konnte ich mit Graßmann und Schleich durch moderne Methodik feststellen, daß die Azidoproteolyten verschiedene Proteasen erzeugen, deren optimaler pH-Gesamtprozeß sich zu hoch für eine Pepsinase erwies, und vielmehr für eine eigentümliche Papainase oder Kathepsinase sprach. Dies wurde später von Janoschek bei Staffe und von Grimmer und Fink bestätigt. Sollte dies nichtsdestoweniger noch nicht genügen, um den Azidoproteolyten eine biochemische Sonderstellung zuzuschreiben, hat kürzlich Gorbach bei manchen Typen sogar eigenartige Azidoproteinasen und Azidopeptidasen gefunden; folgerichtig ist es begreiflich, daß nicht alle Azidoproteolyten in derselben Weise zu derselben Tiefe und bei derselben aktuellen Azidität Eiweißsubstanzen abbauen.

Und warum sollte ich die glücklichen Bestrebungen von Maschmann, Kacholaty und Weil außer acht lassen, um vermittelst eigentümlicher Proteasensysteme und Wirkungen die Verschiedenheit der Lebensverhältnisse und der Lebensäußerungen zwischen aeroben und aneroben Bakterien zu erklären? Die Enzymologie verspricht also schätzbare Hilfsmittel zur physiologischen Bakterienforschung zu liefern.

Aber es ist Zeit, von der reinen zu der angewandten Wissenschaft überzugehen. Hier dienen die Kenntnisse enzymatischer Fähigkeiten der Bakterien je nach den Umweltzuständen dazu, viele Fragen zu lösen und die Mikrobenleistungen sowohl in zymotechnischen als in medizinischen Prozessen zu disziplinieren und zu benutzen. Ich werde nur einige Beispiele ganz kurz erwähnen.

Zymotechnische Prozesse.

Unter den zymotechnischen Prozessen verdient an erster Stelle die Käsereifung genannt zu werden, welcher ich mich seit langem gewidmet habe. Welcher enzymologisch erfahrene Bakteriologe dürfte nunmehr verneinen, daß dieser Prozeß noch ganz im Dunkeln geblieben wäre, solange man nur Milchsäurebakterien und peptonisierende Bakterien, welche nicht imstande waren, Kasein in sauren Medien aufzulösen, kannte und betrachtete? Solange man nicht (nach meiner seit 1894 unveränderten Ansicht) den Azidoproteolyten eine mitarbeitende Rolle zur Förderung der anderen Käsebakterien und der Aromabildung zuerkannte? Solange man nicht überzeugt war, daß bei enzymatischen und namentlich symbiotischen Prozessen nicht so sehr die Menge der einzelnen Bakterienarten als vielmehr die Quantität und die Qualität ihrer Enzymerzeugung und ihrer Enzymabgabe (wie schon oben gesagt), die größte Wichtigkeit besaß; denn die Enzymleistungen setzen sich selbst nach dem Absterben der Zellen fort, deren Zerfallsgeschwindigkeit eben bei den Azidoproteolyten vielbedeutend ist?

Aehnlicherweise möchte ich auf die vorteilhafte Teilnahme der Azidoproteolyten auch bei sämtlichen zymotechnischen Prozessen hinweisen, wo eine Proteolyse ohne Fäulnis stattfinden soll, sowie bei Futterensilage, bei Gerberei, bei Webefasernröstung usw. Statt dessen mögen bei anderen Prozessen die echten Saccharolyten (bei Butter und Yoghurtzubereitung) oder die Alkalinoproteolyten (bei Mistgärungen, bei manchen Weichkäsen) überhaupt not-

wendig sein. Alle diese Kenntnisse werden in der zymotechnischen Industrie zur Herstellung und Anwendung von natürlichen oder kommerziellen oder wissenschaftlichen Enzymprozessen benutzt.

Bei der Konservierung, dem Transport, der Pasteurisierung von Nahrungsmitteln haben die drei Gruppen verschiedenes Verhalten und verschiedene Bedeutung; ebenfalls bei den organischen Zersetzungen im Boden sollen die drei Gruppen verschiedene Rollen spielen. Nur einseitige Forscher könnten alles dies vernachlässigen und entwerten!

[Ich bin froh, daß nicht nur die Königsberger Schule, sondern auch die Kieler Schule und die Weihenstephaner Schule dieser Meinung sowohl in bezug auf die nützlichen als schädlichen Pilze sind. Sicher viele neuere Probleme auf dem Gebiet der Milch- sowie der Nahrungsmittel- und Bodenbakteriologie erwarten ihre Lösung von seiten der Enzymologie.]

Pathologische Prozesse.

Die ersten Beobachtungen über die Beziehungen der mikrobiellen Enzyme zu dem pathologischen Prozesse betreffen den Zusammenhang der proteasischen Aktivität mit der Virulenz der Bakterien; solcher Zusammenhang wurde zuerst von Rosenthal und Patay und später von mir selbst, Weißfeiler, Schern u. a. dargestellt. Heutzutage ist er bei der Plasmakoagulaseprobe und der fibrinolytischen Probe als diagnostisches Hilfsmittel für pyogene und enterotoxische Staphylokokken und bzw. für hämolytische Streptokokken benutzt. Aehnliche Resultate habe ich bei meiner Chymaseprobe mit der „Milchaufagarkultur“ für Streptokokken erhalten. Ferner wird die Toxizität der Staphylokokken und Pneumokokken zu ihrem Redoxopotential in Verbindung gesetzt.

Aber die Proben in vitro genügen sicher nicht, um den Bakterienenzymen pathogene Wirkungen zuzuschreiben. Es ist nötig, den direkten Nachweis ihrer Aktivität in vivo, d. h. im infizierten Organismus zuzugeben. Dieses Problem wird gegenwärtig von verschiedenen enzymologischen Bakteriologen, namentlich von Wohlfeil, studiert.

Insgesamt ist nach allen, bisher ans Licht gebrachten Tatsachen und Erwägungen leicht zu begreifen, daß, obgleich uns noch die Sicherheit über das Vermögen der bakteriellen Enzyme, Blut und Gewebe in lebendem Zustande direkt anzugreifen, fehlt, nichtsdestoweniger den Enzymen als Toxine und Antitoxine, als Aggressine und Antiagressine, als Antigene und Antikörper viele Möglichkeiten zur Verfügung bleiben, bei der Entstehung, der Intoxikation, dem Verlauf, der Immunisierung, der Prophylaxe, der Therapie der Infektionskrankheiten teilzunehmen. Infolgedessen dürfte es nicht gleichgültig sein, sowohl für die Aetiologie als für die Klinik zu beweisen, ob es sich um pathogene Keime handelt, welche bei den einzelnen Fällen vorwiegend proteolytisch (wie überhaupt B. anthracis, B. pyocyaneum, Vibrio cholerae, Salmonella, Brucella) oder vorwiegend saccharolytisch (wie überhaupt die Gruppe B. coli — typhi, B. diphtheriae) oder azidoproteolytisch (wie überhaupt Streptokokken, Staphylokokken, B. pyogenes) wirken. Es soll auch nicht gleichgültig sein, die Natur, die Anzahl, die Menge, den Leichtigkeitsgrad der Aktivierbarkeit und der Befreiung der respektiven Enzyme durch Abgabe und Autolyse zu kennen und zu bestimmen.

Man kann z. B. sich fragen, ob, da die Toxine aus der enzymatischen Zersetzung der Proteine des Organismus herrühren, die Azidoproteolyten (unter gewissen Beziehungen) nicht weniger gefährlich wie die Alkalinoproteolyten sein könnten, weil diese letzteren die Proteine heftiger und tiefer zerstören. Unter den pyogenen Bakterien ist ja das alkalinoproteolytische

B. pyocyaneum gefährlicher als die azidoproteolytischen Staphylokokken. Bekanntlich kann man dem Zerfall der Proteine durch das alkalinoproteolytische B. sporogenes im Organismus mit Injektion von Milchsäure vorbeugen.

Anderseits darf man sich die Frage stellen, ob, da die Enzymen spezifische Antigene erzeugen, eine intensive und rasche Enzymbildung weniger gefährlich sein könnte, denn sie ist imstande, vorzubeugen, daß die Mikroben vor Ausbildung einer hinlänglichen Menge von immunisierenden Antikörper in das Blut übergehen, wie es leider bei den Pyämien und Septikämien vorkommt.

Man mag ferner sich fragen, ob, dank der bekannten (von mir selbst schon längst (1893) und neulich von Wohlfeil u. a. gefundenen) schonenden Wirkung der Zucker auf die Eiweißstoffe, die Schädlichkeit der Saccharolyten hauptsächlich in der tiefen Beschädigung des glykogenischen Stoffwechsels des Organismus besteht, so daß dieser durch die aus der bakteriellen Autolyse herkommenden Proteasen leichter angreifbar wird.

Bezüglich der Therapie verwendet man bisweilen Kulturfiltrate von proteasischen Bakterien zur Immunisierung gegen pathogene Bakterien. Auch der wohlbekannte Einfluß des Metallstoffwechsels und der -behandlung bei den Infektionen findet nach Wohlfeil seine Erklärung in der Wirkung der verschiedenen Metalle (Kupfer und Eisen, Phosphor und Magnesium) auf die bakterielle Enzymbildung und -aktivität.... Aber ich fürchte, die gütige Nachgiebigkeit meiner Kollegen schon zu viel mißgebraucht zu haben und ich verabschiede mich mit der Bitte um Verzeihung, wenn ich, als Nestor der bakteriellen Enzymologie, vielleicht zu weit auf der wissenschaftlichen und praktischen Notwendigkeit bestanden habe, die betreffenden Studien sowohl im zymotechnischen als im medizinischen Gebiet zu verbreiten, zu vertiefen, und zu disziplinieren.

Ich bin durch den Gedanken getröstet, daß ich in einem Land gesprochen habe, wo seit 1907 ein bahnbrechendes Lehrbuch unter dem Titel: „Vorlesungen über Bakterienenzyme" durch Franz Fuhrmann (Graz) erschienen ist.

Ergo: darf ich betonen: sämtliche modernen Bakteriologen müssen enzymologische Bildung besitzen!

15. E. Maschmann (Frankfurt a. M.)[1]:

Ueber Proteinasen und Peptidasen anaerober Bakterien.

I.

Untersuchungen über Bakterienproteasen erweitern und vertiefen nicht nur unsere Kenntnisse über die Träger des Eiweißstoffwechsels und über die Biologie der Produzenten dieser Enzyme. Ihre Ergebnisse können auch bei der Lösung mancher den Bakteriologen interessierenden Probleme von Nutzen sein und sogar praktische Bedeutung haben, nämlich dann, wenn die Proteasen von pathogenen Bakterien stammen, die, außer toxisch zu wirken, auch noch lokale Gewebsveränderungen in mehr oder minder großem Umfange hervorrufen. Ich denke dabei an die sogenannten Gasbranderreger und erinnere nur an die zerstörende Tätigkeit des B. histolyticus in der Muskulatur.

---

1) Aus dem Forschungsinstitut für Chemotherapie, Frankfurt/Main.

An diesen Gewebsschädigungen sind proteolytische Enzyme wesentlich beteiligt. Um ihre extrazelluläre Tätigkeit zu hemmen und dadurch die Gewebsschäden möglichst zu begrenzen, müssen die Gasbrandseren auch einen hohen Antienzymgehalt besitzen. Die Gewinnung solcher Seren und mehr noch die Auswertung ihres Antiproteasengehaltes setzen aber Kenntnisse über die enzymologische Eigenart und auch über das immunbiologische Verhalten der in Frage kommenden Proteasen voraus. Und diese können nur an möglichst hochgereinigten Enzympräparaten gewonnen werden.

Ueber die enzymologische Eigenart einiger dieser Proteasen soll hier kurz berichtet werden. Die praktisch wichtigsten sind die Proteinasen, die interessantesten die Peptidasen, erstere vermögen Eiweißstoffe, letztere niedermolekulare Eiweißabbauprodukte, die sogenannten Peptide, zu spalten.

II.

Die 3 zu beschreibenden Proteinasen, die aus Bouillonkulturen der Gasödembazillen und zum Teil auch aus Kulturen der Typen A und B des B. botulinus isoliert wurden, haben eines gemeinsam: nämlich das Wirkungsoptimum um $p_H = 7$. Dieses fällt ungefähr mit dem Wachstumsoptimum der Produzenten dieser Enzyme zusammen. Sie unterscheiden sich aber voneinander entweder durch ihre Wirkungsbedingungen oder ihren Wirkungsbereich und auch durch ihr Verhalten gegen bestimmte Zusatzstoffe, durch ihre verschiedene Empfindlichkeit im schwach saueren Gebiet oder gegen organische Lösungsmittel.

1. Die „extrazelluläre“ Proteinase der Gasbranderreger[1]): Das besondere Kennzeichen einer bisher nur in den Kulturen der Gasbranderreger aufgefundenen und aus Kulturen der wichtigsten Vertreter dieser Gruppe isolierten Proteinase ist ihr sehr engbegrenztes Wirkungsbereich in vitro: Sie spaltet nämlich nur Gelatine und Glutin, also Umwandlungsprodukte des Kollagens. Ob auch dieses abgebaut wird, steht noch nicht fest, ist aber zu vermuten. Die Proteinase wirkt unter aeroben Bedingungen und ohne einen Hilfsstoff (Aktivator oder Enthemmungskörper) um $p_H = 7$ optimal. Sie ist relativ beständig, auch im sauren Bereich, wodurch ihre Reinigung erleichtert wird: Diese führte bisher zu Präparaten, in denen das Enzym fast 2000fach reiner vorlag als im Ausgangsmaterial. Ein besonders charakteristisches Verhalten gegen anorganische oder organische Substanzen zeigt diese Proteinase nicht. Unter den 4 von uns bisher gereinigten Bakterienproteinasen ist sie die einzige, die durch Normalserum verschiedener Herkunft nicht gehemmt wird.

2. Die „intrazelluläre“ Proteinase der Anaerobier, die Anaerobiase[2]): Eine weitere Proteinase, die wir außer in den Kulturen der Gasbranderreger, des B. paludis, B. ovitoxicus nnd des Erregers der Lämmerdysenterie auch noch in den Kulturen der Typen A, B und D des B. botulinus aufgefunden haben, ist durch die Abhängigkeit ihrer Wirksamkeit vom Redoxpotential gekennzeichnet. Dementsprechend wird die in den Bouillonkulturen vorliegende, in vitro nur teilweise wirksame Proteinase durch bestimmte Redoxsubstanzen, beispielsweise durch α- und β-SH-Verbindungen, aber nicht durch Askorbinsäure ziemlich stark aktiviert; in hochgereinigten Präparaten liegt sie in inaktiver Form vor, durch Zystein usw.

1) Vgl. E. Maschmann, Biochem. Z. III., IV., V. u. XI. Mitt. über Bakterienproteasen **295**, 351 (1938); **295**, 391 (1938); **295**, 400 (1938); **300**, 89 (1938/39); VIII. Mitt., Vortrag Internat. Kongreß f. Chemie in Rom 1938.

2) Vgl. E. Maschmann, II., III., VII. u. IX. Mitt. über Bakterienproteasen. Biochem. Z. **295**, 1, 351 (1937/38); Naturwiss. **26**, 139 (1938); Biochem. Z. **297**, 284 (1938).

wird diese in die aktive Form übergeführt. Die Proteinase verhält sich demnach gegen SH-Verbindungen ähnlich wie die sogenannten Papainasen, das sind die tierischen und pflanzlichen intrazellulären Proteinasen. Die Anaerobiase, wie wir das Enzym genannt haben, wurde aus Bouillonkulturen des Gasbazillus, nach ihrer Abtrennung von der zuerst angeführten Proteinase, ungefähr 500fach, aus Kulturen des Typus A des B. botulinus, in dem sie anscheinend als einzige Proteinase vorkommt, ungefähr 200fach reiner dargestellt als sie darin vorlag. Sie ist wenig beständig, wird schon im schwach sauren Gebiet rasch zerstört und zeigt sich auch gegen organische Lösungsmittel ziemlich empfindlich. Ihr Wirkungsbereich gleicht ungefähr dem der Papainasen und dem der von uns früher beschriebenen aerob wirksamen Prodigiosus- und Pyozyaneusproteinase.

Ihre Einheitlichkeit ist aber durch folgendes Verhalten in Frage gestellt: Die ungereinigte Anaerobiase spaltet nach Aktivierung (außer Kasein, Gelatine usw.) auch Klupein weitgehend auf, im gereinigten Zustand ist sie dazu aber nicht mehr imstande. Nach Hinzufügen des abgetrennten Anteils vermag sie wieder, wie anfänglich, Klupein zu zerlegen. In dem auf verschiedenen Wegen abtrennbaren Anteil liegt eine thermostabile und dialysable Substanz vor, der die Funktion eines Co-Enzyms zukommt. Da dieses Co-Enzym nur zur Klupeinspaltung, aber nicht zur Kasein- und Gelatinespaltung notwendig ist, deutet dieser Befund darauf hin, daß in den hochgereinigten Anaerobiasepräparaten zwei Enzyme vorliegen, genauer ein inaktives durch Zystein aktivierbares Enzym und ein Apoenzym, dessen Co-Enzym bei der Reinigung abgetrennt worden ist. Weitere Versuche müssen die Berechtigung dieser Vermutung erweisen.

Die Anaerobiase wird durch normales Serum deutlich gehemmt.

3. Die Sporogenesproteinase[1]): Die dritte Proteinase wurde in Bouillonkulturen 4 verschiedener Stämme des B. sporogenes aufgefunden und daraus — frei von anderen Proteasen — ungefähr 200mal reiner dargestellt. Ihre Reinigung wird durch die ziemliche Unbeständigkeit des Enzyms, besonders im schwach sauren Gebiet, sehr erschwert. Bisher konnte die Proteinase, die wir vorerst kurz als Sporogenesproteinase bezeichnen wollen, in Kulturen anderer Bakterien nicht eindeutig nachgewiesen werden. Wir vermuten sie noch in den Kulturen des B. histolyticus. Die Sporogenesproteinase ist unter aeroben Bedingungen und ohne einen Hilfsstoff (Aktivator oder Enthemmungskörper) um $p_H = 7$ optimal wirksam. Sie gleicht also in bezug auf die Wirkungsbedingungen der Pyozyaneusproteinase und nicht, wie wir eigentlich angenommen haben, der Anaerobiase. Sie unterscheidet sich aber auf Grund ihres Wirkungsbereiches, ihres Verhaltens gegen bestimmte Zusatzstoffe und ihrer Labilität in charakteristischer Weise von der Pyozyaneusproteinase: Während das Spaltungsvermögen dieser für Gelatine zwei- bis dreimal größer ist als für Kasein, Ovalbumin und Pepton (Witte), ist das der Sporogenesproteinase für Kasein 8—16mal größer als für Ovalbumin, Pepton und Gelatine. Im Gegensatz zur Pyozyaneusproteinase greift die Sporogenesproteinase, unter den von uns angewandten verschiedenartigen Bedingungen, Klupein nicht an. Der Nichtbeeinflußbarkeit der Pyozyaneusproteinase durch Zitronensäure und ihrer Stabilität auch im hochgereinigten Zustand steht die Hemmbarkeit der Sporogenesproteinase durch Zitronensäure und ihre Labilität im schwachsauren Gebiete (unterhalb $p_H = 5{,}4$), auch schon im ungereinigten Zustand, entgegen. Bemerkenswert ist noch die vollständige Hemmung der Sporogenesproteinase durch Blausäure. Welche

1) Vgl. XI. Mitt. über Bakterienproteasen. Biochem. Z. **300**, 89 (1938/39).

Beziehungen zwischen Enzym und Blausäure diese Hemmung verursachen, ist noch nicht ganz geklärt. Möglicherweise handelt es sich hierbei um den Entzug eines für die Wirksamkeit des Enzyms notwendigen Metalls oder um die Besetzung einer zur Wirksamkeit notwendigen Karbonylgruppe. Auch die Sporogenesproteinase wird von einem hohen Prozentsatz normaler Seren mehr oder minder deutlich gehemmt[1]).

III.

Wenn wir sagen, daß eine der gekennzeichneten Proteinasen von verschiedenen Bakterienarten gebildet wird, so stützen wir uns dabei auf das im wesentlichen gleiche enzymologische Verhalten der Proteinasen verschiedener Herkunft, und zwar im hochgereinigten Zustande; d. h. auf gleiche Wirkungsbedingungen und gleichen Wirkungsbereich, gleiches Verhalten gegen bestimmte Zusatzstoffe, gleiche Stabilität bzw. Labilität usw. Ob die enzymologisch identischen Proteinasen verschiedener Herkunft auch immunbiologisch, d. h. chemisch identisch sind, vermögen wir noch nicht zu sagen; wir hoffen aber, mit Hilfe möglichst hochgereinigter Enzympräparate vom Tierversuch eine eindeutige Antwort auf diese sehr wichtige Frage zu erhalten.

IV. Die Peptidasen der Anaerobier.

Eine sehr bemerkenswerte Gruppe von Proteasen sind die Peptidasen der anaeroben Bakterien, kurz Anaeropeptidasen genannt. Wir haben sie bisher in den Kulturen folgender Anaerobier nachgewiesen: Welch-Fraenkelscher-Gasbazillus, B. histolyticus, B. oedematiens, Para- und Rauschbrandbazillus, B. sporogenes, B. botulinus Typ A, B, C und D, B. tetani, Erreger der Lämmerdysenterie, B. paludis und B. ovitoxicus. Die Bouillonkulturen dieser Bakterien sind in der Regel aminopolypeptidatisch nur wenig wirksam, dipeptidatisch fast oder ganz unwirksam. Durch Zusatz von Eisen(II)salz oder von Zystein werden die Kulturen nur schwach, durch Zusatz beider Substanzen aber immer stark peptidatisch wirksam. Die peptidatische Wirkung wird durch Blausäure augenblicklich und vollständig gehemmt[2]).

Wir haben uns zunächst bei den Dipeptidasen um die Aufklärung des Aktivierungsvorganges bemüht und nach Ermittlung des Wirkungsoptimums der aktivierten Dipeptidasen — das wir um $p_H = 7{,}8$ finden — auch ihr Wirkungsvermögen für 5 verschiedene Dipeptide bestimmt. Auf Grund der Ergebnisse dieser Versuche[3]) sind wir zur folgenden Auffassung der Aktivierung und der Natur der Dipeptidasen gelangt, deren stichhaltige Begründung unsere nächste Aufgabe sein wird.

1. Die „Aktivierung der Anaerodipeptidasen“ durch Eisen(II)salz und Zystein ist nichts anderes als eine Synthese dieser Enzyme aus „Fermentprotein“ (Apoenzym) und Eisen (Co-Enzym). Das Zystein, dessen Funktion auch noch von anderen SH-Verbindungen und Natriumsulfit übernommen werden kann, dient in vitro zur Aufrechterhaltung der Zweiwertigkeit des Metalls. Die Anaerodipeptidasen sind demnach Metall(II)proteide.

2. In den Kulturen der verschiedenen Anaerobier liegen mehrere Apoenzyme in wechselndem Mengenverhältnis vor. Daraus erklärt sich das oft sehr verschiedenartige dipeptidatische Wirkungsvermögen dieser Kulturen.

---

1) Ueber den in einem hohen Prozentsatz normaler Seren vorliegenden Hemmungskörper, vgl. XI. Mitt., Biochem. Z. **300**, 90 (1939).

2) E. Maschmann, Naturwiss. **26**, 791 (1938).

3) Vgl. Naturwiss. **27**, 276 (1939) u. XII. Mitt. über Bakterienproteasen, Biochem. Z. (im Druck).

3. Als Co-Enzym wirkt hauptsächlich zweiwertiges Eisen, aber in bestimmten Fällen kann Mangan das Eisen vollwertig ersetzen. Dann zeigt sich gegenüber alaninhaltigen Dipeptiden Mangan als Co-Enzym dem Eisen überlegen.

V.

Welche Bedeutung haben die in den Kulturen nachweisbaren Proteasen für die Bakterien? Zum Verständnis kann man sich dabei vorerst nur auf die Eigenart der Enzyme und ihr zeitliches wie mengenmäßiges Auftreten in der Kulturflüssigkeit während des Bakterienwachstums stützen. Folgende Auffassung steht mit den Tatsachen am besten in Einklang: 1. Die Proteinase mit sehr engbegrenztem Wirkungsbereich scheint für die Gasbranderreger typisch zu sein. Sie wird vom Histolytikusbazillus in außerordentlich großer Menge produziert; der Gasbazillus vermag davon nur ungefähr den 15. bis 20. Teil zu bilden, eine Enzymmenge, die im Vergleich zu der von anderen Bakterien gebildeten, aber immer noch sehr beachtlich ist; der Para- und Rauschbrandbazillus und der Novybazillus bilden dagegen nur geringe Mengen dieser Proteinase. Das Enzym tritt sehr rasch in der Kulturflüssigkeit auf: In Versuchsreihen mit dem Welch-Fraenkelschen Gasbazillus waren schon nach 3stünd. Kulturdauer 75, nach 4stünd. Kulturdauer fast 100 Proz. der in 24—96stünd. Kulturen überhaupt nachweisbaren Enzymmenge in der Kulturflüssigkeit vorhanden. Die nach kurzer Kulturdauer anfallenden, gewaschenen Bazillen vermögen Gelatine praktisch nicht mehr zu spalten. Wir möchten das schnelle Auftreten dieser Proteinase, und zwar noch vor Beginn der ungefähr in der 8. Stunde einsetzenden autolytischen Vorgänge, auf eine Sekretion des Enzyms zurückführen. Ob dies aber richtig ist, werden erst sorgfältige Versuche über die Wachstums- und Zerfallsgeschwindigkeit des Gasbazillus entscheiden. Auf welchem Wege auch immer die Proteinase in die Kulturflüssigkeit gelangt, Tatsache ist, daß sie dort sehr rasch und im Falle des B. histolyticus und B. perfringens in großen Mengen auftaucht. Auch das engbegrenzte Wirkungsbereich dieser Proteinase, die verhältnismäßig weitgehende Unabhängigkeit ihrer Wirksamkeit vom Milieu und von irgendwelchen fördernden Substanzen, ihre Nichthemmung durch normales Serum und ihre relative Beständigkeit, weisen auf eine bestimmte, sehr wahrscheinlich extrazelluläre Bedeutung bzw. Tätigkeit in vivo hin.

Dem Schrifttum, das sich mit den durch die Gasbranderreger bewirkten Gewebsveränderungen befaßt, kann entnommen werden, daß alsbald nach erfolgter Infektion der Zerfall der Muskelschläuche (Sarkolemmhülle) einsetzt. Es ist nun naheliegend, den Zerfall des peri- und intramuskulären Bindegewebes mit der Tätigkeit der Proteinase in Verbindung zu bringen und in der durch das Enzym bewirkten Auflösung der dieses Gewebe umgebenden Grundsubstanz, die hauptsächlich aus Kollagen bestehen soll, die Ursache des Bindegewebszerfalls zu erblicken. Die spezifische Einstellung des Enzyms auf die Grundsubstanz des Bindegewebes würde auch seinen engbegrenzten Wirkungsbereich in vitro plausibel erklären.

Auf eine weitere Bedeutung dieser Proteinase, beispielsweise für den Gasbazillus und dessen Virulenz, scheinen folgende Angaben hinzuweisen.

Gewaschene Fraenkelsche Gasbazillen aus flüssigen Kulturen, von ihrer Kulturflüssigkeit getrennt, sind nicht infektiös. „Dagegen kann eine Emulsion gewaschener Bazillen, gemischt mit einer untertödlichen Giftdosis, eine typische Gasgangrän mit schnellem Tode hervorrufen. Das Gift fördert demnach die Entwicklung des Fraenkelschen Gasbazillus (Bac. Welchii) im Tierkörper und hat in dieser Hinsicht aggressive Eigenschaften. Wahrscheinlich wirken

zwei Teilfaktoren beim Zustandekommen der Aggressinwirkung, nämlich einmal die nekrotisierende, welche nach Bullock und Cramer sowie Weil nicht spezifisch zu sein braucht, andererseits die antiphagozytäre Wirkung des Toxins, die spezifisch ist."[1])

Das, was im „Gift" (d. h. im Kulturfiltrat) auf die Entwicklung des Bazillus fördernd wirkt, sind meines Erachtens nicht so sehr die Toxine als die Enzyme bzw. die Produkte ihrer Tätigkeit. Es ist wahrscheinlich, daß der nekrotisierende Faktor der Aggressinwirkung mit der Proteinase identisch bzw. daß diese ein Teilfaktor ist, und daß die gewaschenen Bazillen dieses Enzym nicht mehr besitzen und es auch nicht mehr zu bilden vermögen. Um die Berechtigung dieser Ansicht zu prüfen, soll untersucht werden: 1. Welche Proteasen gewaschene Bazillen noch besitzen; 2. ob die gereinigte Proteinase allein oder in Kombination mit noch anderen Bestandteilen des Kulturfiltrates Gewebe zu nekrotisieren vermag; 3. ob gewaschene Bazillen mit gereinigter Proteinase zusammen infektiös sind und 4. ob man die Perfringensproteinase in Versuch 3 durch Proteinasen anderer Herkunft ersetzen kann.

2. Die Anaerobiase ist auf Grund der weitgehenden Abhängigkeit ihrer Wirksamkeit vom Milieu und ihres sonstigen Verhaltens zweifelsohne ein intrazelluläres Enzym. Da wir diese Proteinase außer in den Kulturen der Gasbranderreger auch noch in den des B. paludis, B. ovitoxicus und der Typen A und B des B. botulinus in verhältnismäßig großer Menge aufgefunden haben, sind wir der Ansicht, daß die Anaerobiase nicht nur ein intrazelluläres Enzym, sondern die intrazelluläre Proteinase vieler (vielleicht aller) anaerober Bakterien ist. Sie gehört ebenso wie die unter anaeroben Bedingungen optimal wirksamen Peptidasen zu dem Proteasensystem, das für den Eiweißstoffwechsel der Anaerobier verantwortlich ist.

VI.

Die beschriebenen Proteasen, Proteinasen und Peptidasen, sind meines Erachtens Enzyme, die von den Bakterien immer gebildet werden, unabhängig von der Zusammensetzung des Milieus, in welchem sie wachsen. Man bezeichnet solche Enzyme als „konstitutive" Enzyme, im Gegensatz zu den „adaptiven", die nur „bei Bedarf", durch Gewöhnung (Adaptation) der Organismen an spezifische Substrate gebildet werden sollen. Ob eine Trennung in konstitutive und adaptive Proteasen berechtigt ist, vermögen wir mangels eigener Erfahrung nicht zu beurteilen. Die Frage kann aber nur stichhaltig beantwortet werden durch die Abtrennung des vermeintlichen adaptiven vom konstitutiven Enzym und durch Vergleich des enzymologischen Verhaltens beider im hochgereinigten Zustand.

Die zu den Untersuchungen notwendigen sehr zahlreichen und oft verhältnismäßig großen Mengen Bouillonkulturen der verschiedenen anaeroben Bakterien wurden uns teilweise von Herrn Prof. R. Prigge vom Staatsinstitut für experimentelle Therapie, zum größten Teil aber von Herrn Dr. A. Demnitz von den Behringwerken in Marburg-Lahn zur Verfügung gestellt. Diesen Herren dafür aufrichtig zu danken, ist mir mehr als eine angenehme Pflicht.

---

1) J. Zeissler, „Die Gasodeminfektionen des Menschen", im Handb. d. pathog. Mikroorganismen, 3. Aufl. 4, 2, 1097, 1928, und zwar S. 1106.

16. Alexander Janke, unter Mitwirkung von J. Holota, E. Mikschik und H. Hofmann:

Zur Frage der Abgabe proteolytischer Enzyme durch die Mikroorganismen[1].

1. Bisherige Bearbeitung des vorliegenden Problems.

Seit der Einführung der Gelatinenährböden in die Bakteriologie durch Robert Koch unterscheidet man die Mikroben in Verflüssiger und Nichtverflüssiger. Hierbei war die vorherrschende Meinung der Bakteriologen (5), daß die Nichtverflüssiger die wirksamen Proteinasen als sog. Endoenzyme enthalten, die erst beim Absterben der Organismen frei werden, die Verflüssiger aber auch als Ektoenzyme, welche die lebenden Zellen sezernieren. Dieser Ansicht ist später durch Rettger (13), Euler (1) und vor allem durch Oppenheimer (12) widersprochen worden; die genannten Forscher machen nur die aus den abgestorbenen Zellen frei werdenden Enzyme allein für die proteolytische Wirkung verantwortlich.

Die Angelegenheit der Proteinasenabscheidung durch die Mikrobenzelle ist in letzterer Zeit durch die Kontroverse zwischen Virtanen (Helsinki) und Gorbach (Graz) wieder in den Vordergrund des Interesses gerückt.

Virtanen und Tarnanen (15) haben in einer 15 Std. alten Kultur von Ps. fluorescens nach dem Abzentrifugieren keine Kaseinspaltung durch die Bakterienmasse feststellen können und daraus den Schluß gezogen, daß die Proteinasen sezerniert werden. Gorbach und Pirch (2) entnehmen einer wachsenden Kultur von Ps. fluorescenz zu verschiedenen Zeiten Proben und lassen dieselben nach Entkeimung mittels Bakterienfilter auf Gelatine als Substrat einwirken. Sie meinen aus ihren Untersuchungen den Schluß ziehen zu können, daß die Menge des in Lösung gegangenen Stickstoffs der Prozentzahl an nicht vermehrungsfähigen Zellen bezogen auf die Gesamtzahl proportional sei, woraus gefolgert wird, daß nur die abgestorbenen Zellen Proteinasen abgeben. Daß diese Schlußfolgerung nicht zwingend ist, soll später gezeigt werden. Neuerliche Versuche von Virtanen und Suolahti (14) an einem aus Abwasser isolierten Stamm von Ps. fluorescens ergaben nach einer Kulturdauer von 10 Std. in der Bakterienmasse keinen Kaseinabbau mehr, woraus die genannten Forscher schlossen, daß zu diesem Zeitpunkt der verwendete Fluorescensstamm die Proteinase bereits quantitativ sezerniert hatte. In einer folgenden Arbeit bestreiten Gorbach und Pirch (3) die Beweiskraft der Virtanenschen Versuche unter Hinweis auf den Umstand, daß Kasein zur Bestimmung der Proteinase der Ps. fluorescens kein geeignetes Substrat ist.

Ferner hat Moycho (10) bei B. prodigiosum beobachtet, daß eine Rosafärbung des Nährmediums mit der durch diese Bakterie bewirkten Proteolyse parallel geht. Da der genannte Forscher nun annimmt, daß das Prodigiosin nur aus den abgestorbenen Zellen austritt, zieht er den Schluß, daß auch die Proteinasenabgabe an den vorherigen Zelltod geknüpft sei. Der Umstand jedoch, daß auch unter Zusatz von Toluol kein Eiweißabbau eintrat, läßt vermuten, daß in den betreffenden Fällen überhaupt keine freie Proteinase in den betreffenden Zellen vorhanden war, zumal sich aus den Versuchen von Gorbach ergibt, daß mit zunehmender Vermehrung der Bakterien bei konstantem Volumen des Nährmediums die Proteinaseproduktion rapid zurückgeht.

Berichterstatter ist dem Problem der Proteinaseabgabe durch Mikroorganismen schon vor vielen Jahren experimentell nähergetreten, und zwar trachtete er den Enzymaustritt aus den Bakterienzellen durch Behandeln derselben mittels Chloroform zu beschleunigen.

---

1) Aus der mikrobiologischen Abteilung des Instituts für Biochemische Technologie an der Technischen Hochschule in Wien (Vorstand: Prof. Dr. A. Janke).

Wenn in einer Population von Verflüssigern nur die geschädigten Zellen Proteinasen abgeben, dann muß im Falle der Chloroformbehandlung der Eiweißabbau so wie bei den Nichtverflüssigern stärker in Erscheinung treten als bei den unbehandelten Mikroben. Da es sich damals zunächst um den Kaseinabbau durch Bact. coli handelte, kam Kasein als Substrat zur Anwendung. Es wurden sowohl verflüssigende als auch nichtverflüssigende Bakterien (6) und später auch Sproß- und Schimmelpilze (7) untersucht mit dem einheitlichen Ergebnis, daß bei den Nichtverflüssigern erwartungsgemäß die mit Chloroform behandelten Zellen erheblich stärker abbauten als die unbehandelten, während bei den Verflüssigern der Abbau im wesentlichen unverändert, ev. sogar etwas abgeschwächt erschien. In jüngster Zeit dehnten wir die Versuche auf Gelatine als Substrat aus und arbeiteten zum Teil auch mit keimfrei filtrierten Enzymlösungen.

2. Die Chloroformbehandlung zwecks Steigerung des Enzymaustritts aus der Zelle.

Bereits Kisch (9) hatte die Schädigung der Zellgrenzschichten durch oberflächenaktive Stoffe für quantitative Zwecke verwertet, und zwar bediente er sich des Invertaseaustritts aus Sproß- und Schimmelpilzen, um einen zahlenmäßigen Ausdruck für die Stärke der Schädigung zu erhalten.

Berichterstatter hingegen (6, 7) benutzte diese Methode, um den Austritt der Proteinasen aus der Zelle zu beschleunigen und so einen Schluß auf die Menge der noch innerhalb der Zelle sich frei vorfindenden Proteinasen ziehen zu können. Die Anwendung dieser Methode auf die Untersuchung der proteolytischen Wirkung der Mikroben gestaltet sich folgendermaßen:

1. Herstellung von Massenkulturen auf festen Nährböden in Roux-Flaschen durch Aufbringen einer Suspension von Mikroben, wobei die Suspensionsflüssigkeit in 1 mm hoher Schicht den horizontal gelagerten erstarrten Nährboden bedeckt. Als Nährboden kommt bei Bakterien Nähragar bzw. Hefewasseragar, bei Sproß- und Schimmelpilzen Würzeagar zur Verwendung. Bei Bakterien und Sproßpilzen genügt zumeist eine Kulturdauer von 48 Std. um eine üppige Entwicklung zu erhalten.

2. Abschlämmen der Mikroben mittels physiologischer Kochsalzlösung. [Ev. Abschleudern in der Elektrozentrifuge, Auswaschen mit physiol. Kochsalzlösung und nochmaliges Abschleudern.] Herstellung einer Suspension von 10—1000 Millionen Zellen im ccm.

3. Feststellung der Gesamtzahl der Zellen nach der Hefemischmethode (8).

4. Abschwächung der Hälfte der Suspension durch Behandeln mit Chloroform in einer sterilen Glasstöpselflasche während einer halben Stunde. Hierdurch Schädigung der Grenzschichten und Erhöhung der Permeabilität für Enzyme. Hierauf ev. Abtreiben des Chloroforms im Vakuum.

5. Ermittlung der Zahl der vermehrungsfähigen Zellen in der ungeschwächten und in der geschwächten Kultur nach dem Kochschen Plattenverfahren.

6. Einbringen eines bestimmten Volumens von jeder der beiden Suspensionen in ein eiweißhaltiges Substrat und Feststellung des Abbaus innerhalb einer relativ kurzen Zeitspanne (möglichst bloß 24 Std.). Dehnt man den Abbau über eine längere Zeit aus, so treten Verschiebungen in der Zellenzahl infolge Assimilation der Abbauprodukte ein. Oder besser

6a. Keimfreie Filtration der Suspensionen durch Göttinger Ultrafeinfilter oder durch Jenaer Glassinterfilter 5 auf 3. Vorheriges Zentrifugieren erleichtert die Filtration wesentlich.

3. Der Anteil vermehrungsfähiger Zellen an Mikrobenpopulationen.

Da mit der Möglichkeit gerechnet werden mußte, daß der Unterschied zwischen Verflüssigern und Nichtverflüssigern nur darin besteht, daß die ersteren rascher absterben und so größere Mengen Proteinasen an das Nährsubstrat abgeben, war es nötig, den Anteil der vermehrungsfähigen Zellen an Mikrobenpopulationen festzustellen.

Die Ermittlung der Gesamtzahl der Mikroorganismen durch direktes Auszählen läßt sich — gleichmäßige Verteilung vorausgesetzt — mit ziemlicher Genauigkeit durchführen, die im wesentlichen vom Arbeitsaufwand abhängt und nach den Methoden der Variationsstatistik angegeben werden kann. Erstreckt sich beispielsweise die Auszählung auf 5000 Zellen, so kann man mit einer Zuverlässigkeit der ermittelten Keimzahl von $\pm$ 3 Proz. rechnen. Wesentlich ungünstiger liegen die Verhältnisse bei Feststellung der vermehrungsfähigen Zellen

mittels des Plattenverfahrens. Hierbei hat man mit der Unsicherheit zu rechnen, die im Auftreten mehr minder großer Verbände von Teilungs- bzw. Sproßzuständen gelegen ist. Man wird auf jeden Fall eine zu geringe Zahl an vermehrungsfähigen Zellen erhalten und daher diese als unteren Grenzwert betrachten müssen.

Um einen Einblick in die Größe dieser Abweichung zu bekommen, ermittelten wir an einer Suspension von Sacch. carlsbergensis Rasse Pankow, deren Gesamtzellenzahl bekannt war, die Zahl der vermehrungsfähigen Zellen nach zwei verschiedenen Methoden. Einmal nach dem Kochschen Verfahren mit Würzegelatine und ein andermal nach dem Lindnerschen Tropfchenverfahren mit Woltjelösung, wobei das Tropfchenvolumen durch Wagung festgestellt wurde. Hierbei ergab sich, daß bei der letztgenannten Methode 73 Proz. der Gesamtzahl der Zellen Entwicklung zeigten, während nach dem Plattenverfahren nur 54 Proz. als vermehrungsfähig erkannt wurden. Dies wird durch die Feststellung verständlich, daß nahezu 80 Proz. aller Zellen zu zweit auftraten. Im vorliegenden Fall waren demnach mittels des Plattenverfahrens um 19 Proz. zu wenig vermehrungsfähige Zellen gefunden worden. Bezieht man diesen Mindergehalt auf die gefundenen 54 Proz., so ergibt sich ein Ausfall von mehr als 30 Proz. Bei Sproßpilzen liegen die Verhältnisse sicher nicht immer so ungünstig wie im vorliegenden Falle, wo nur 10 Min. am Elektroapparat geschüttelt worden war, aber bei Bakterien, die bekanntlich sehr zur Häufchenbildung neigen, wird man wohl mit einem ähnlich großen Fehler bei der Bestimmung der vermehrungsfähigen Zellen rechnen müssen.

Die Tabelle I bringt nun eine Zusammenstellung der Ergebnisse betreffend die Ermittlung der vermehrungsfähigen Zellen in Populationen von Bakterien und Sproßpilzen. Alle diese Mikroorganismen waren auf Agar bis zur üppigen Entwicklung herangewachsen, was zumeist in 48 Std. der Fall war. Es zeigt sich, daß zwischen den Nichtverflüssigern [Bact. coli, B. punctatum, Sacch. cerevisiae, der Spiritushefe Rasse XII, Hansenula anomala, Mycoderma vini und Myc. Lafarii] einerseits und den

Tabelle I.
Prozentmäßiger Anteil der vermehrungsfähigen Zellen an der Gesamtzellzahl bei Bakterien-, Sproßpilz- und Schimmelpilz-Populationen. [Mindestwerte.]

Mikrobenart	Gesamtzahl in Millionen je ccm	Vermehrungsfähige Zellen	
		in Millionen je ccm	in Proz. der Gesamtzahl
Bact. coli comm. [Stamm Smyth]	1) 100	24	24
	2) 882	385	43,7
	3) 6470	2600	40,2
Bact. coli sim. [Stamm Flexner]	1) 500	129	25,8
	2) 100	34	34
	3) 7600	3750	49,3
	4) 4000	1600	40,0
Bact. putidum	4270	1000	23,4
Pseudomonas fluorescens	1) 100	27,4	27,4
	2) 3500	2100	60,0
	3) 9630	1300	13,5
Bac. acidificans praesamigenes casei	358	304	85
Sacch. cerevisiae	46,9	18,6	39,7
Spiritushefe Rasse XII	31,6	17	53,8
Hansenula anomala	48,6	38,5	79,2
Mycoderma vini	41,4	40,1	96,9
Mycoderma Lafarii	25,5	18,6	73
Kloeckera apiculata	1) 63,2	60	94,9
	2) 43,8	40	91,3
	3) 27,7	13	47,0

Verflüssigern [Ps. fluorescens, Bac. acidificans praesamigenes casei und Kloeckera apiculata] andererseits kein grundsätzlicher Unterschied besteht. In beiden Gruppen finden wir starke Schwankungen, die offenbar auf die Kulturbedingungen und den physiologischen Zustand der Aussaatzellen zurückzuführen sind. Wohl konnten wir bei Ps. fluorescens mit 13,5 Proz. die niedrigste aller festgestellten Lebendprozentzahlen, aber auch die zweithöchste bei Bakterien beobachtete Zahl von 60 Proz. lebender Zellen antreffen. Besonders auffällig sind die hohen Prozentsätze lebender Zellen bei Kloeckera apiculata, dem einzigen Verflüssiger unter den untersuchten Sproßpilzen.

Die größere oder geringere Sterblichkeit der Mikroorganismen ist demnach nicht rassebedingt und steht auch mit dem Vermögen zur Gelatineverflüssigung in keinem ursächlichen Zusammenhang.

4. Kaseinabbau-Versuche.

Wie oben bereits bemerkt, wurden die Abbauversuche zunächst mit Kasein durchgeführt, weil es sich darum handelte, festzustellen, ob normal herangewachsene Populationen verschiedener Stämme des Bact. coli zum Kaseinabbau befähigt sind. Als Substrat kam eine 1proz. Lösung von Kasein (Hamarsten) in dest. Wasser zur Anwendung, und zwar wurde das Kasein in n/10-Lauge gelöst und dann durch vorsichtigen Zusatz von HCl auf ein p_H von etwa 7,5 gebracht. Zur Untersuchung des Abbaues diente die von Münchberg (11) angegebene Methylalkoholmethode.

Ausführung: Zu 2 ccm der aus dem Versuchsgefäß entnommenen und in ein 20 ccm-Meßkölbchen eingebrachten Probe werden 0,4 g krist. $MgSO_4$ hinzugefügt und hierauf mit Methanol (pro anal. Merck) bis zur Marke aufgefüllt. Nach kräftigem Schütteln und Filtrieren durch ein gehärtetes Filter erfolgt in 2 ccm des Filtrates die Bestimmung des in Lösung gegangenen Stickstoffs nach dem Mikrokjeldahlverfahren.

Tabelle II.
Kaseinabbau mit ungeschwächten und geschwächten Populationen.

Mikrobenart	Einwirkungsdauer in Std.	Zunahme des methanollosl. N in Proz. des Anfangswertes		Differenz g—u	
		ungeschwächt (u)	geschwächt (g)		
Bact. coli comm. . .	24	9,2	29,7		+ 20,5
Bact. coli sim. . . .	24	9,7	15,4		+ 5,7
Bact. putidum . . .	24	0	18,0		+ 18,0
Streptococcus lactis .	24	4,3	56,8		+ 52,5
Pseudomonas fluoresc.	24	12,3	7,7	— 4,6	
Bact. prodigiosum . .	24	44,4	30,0	— 14,4	
Sacch. cerevisiae . .	48	25,0	55,7		+ 30,7
Hansenula anomala .	72	3,7	39,7		+ 36,0
Spiritushefe Rasse XII	24	0	24,9		+ 24,9
Mycoderma vini . .	48	0	34,9		+ 34,9
Kloeckera apiculata .	48	100,0	60,1	— 39,9	
Fusarium sp. E 13 .	24	0	87,6		+ 87,6
Aspergillus niger . .	18	100,0	56,9	— 43,1	

Aus den in Tabelle II niedergelegten Werten geht hervor, daß alle Nichtverflüssiger in der mit Chloroform geschwächten Population einen wesentlich stärkeren Kaseinabbau zeigten als in der ungeschwächten, während bei den Verflüssigern das Umgekehrte der Fall war. Daß im letzteren Falle der Minderabbau in der geschwächten Kultur nicht auf eine Hemmung durch das Chloroform allein zurückzuführen ist, geht daraus hervor, daß sich derselbe auch dann beobachten läßt, wenn man das Chloro-

form im Vakuum abzieht. Es dürfte sich vielmehr zum Teil auch um einen Verbrauch der Abbauprodukte für die Zellneubildung handeln, die in der geschwächten Suspension wegen der geringen Zahl lebender Zellen wesentlich leichter eintreten wird als in der ungeschwächten.

Daß bei den Nichtverflüssigern nur die vermehrungsunfähigen Zellen am Eiweißabbau beteiligt sind, wurde schon seinerzeit (6) bewiesen, und zwar durch Berechnung der je Million nicht vermehrungsfähiger Zellen abgebaute Kaseinmenge, einerseits für die ungeschwächte, andererseits für die mittels Chloroform geschwächte Population. Hierbei ergab sich im ersteren Falle $3{,}8 \cdot 10^{-9}$ mg und im letzteren $3{,}9 \cdot 10^{-9}$ mg N, also innerhalb der Fehlergrenzen der gleiche Wert. Bei den Verflüssigern liegen entsprechend Tabelle II die Verhältnisse wesentlich anders. Hier ist die Permeabilitätserhöhung der Grenzschichten durch die Chloroformbehandlung auf die Enzymabgabe ohne Einfluß, was wohl zu bedeuten hat, daß innerhalb der Zellen keine freien Proteinasen mehr vorhanden sind, da dieselben offenbar bereits aus den vermehrungsfähigen Zellen ausgetreten sind.

5. Abbauversuche mit Gelatine als Substrat.

Da Gorini (4) bereits vor längerer Zeit erkannt hatte, daß die kaseinverdauende und die gelatinelösende Wirkung der Bakterien keineswegs parallel gehen, können Versuche mit Kasein als Substrat nicht als beweisend für die Gelatineverflüssigung angesehen werden. Deshalb wurden unsere Abbauversuche auch auf Gelatine als Substrat ausgedehnt und der Abbau der letzteren durch Formoltitration ermittelt.

Tabelle III.
Gelatineabbau durch Bact. coli.

Gesamtstickstoff: 3,19 mg je ccm
Bakterienzahl {Gesamt-: 100 Millionen je ccm; vermehrungsfähig in Proz. der Gesamtzahl {ungeschwacht (u): 28 Proz.; geschwächt (g): 0,12 „

Einwirkungsdauer in Stunden	Formoltitrierbarer N in mg je ccm		Zunahme in Proz. des nicht formoltitrierbaren Anfangs-N	
	u	g	u	g
0	0,172	0,172	0	0
24	0,192	0,227	0,66	1,82
48	0,224	0,250	1,72	2,58

Tabelle IV.
Gelatineabbau durch Pseudomonas fluorescens.

Gesamtstickstoff: 3,24 mg je ccm
Bakterienzahl {Gesamt-: 130 Millionen je ccm; vermehrungsfähig in Proz. der Gesamtzahl {ungeschwächt (u): 32 Proz.; geschwächt (g): 0,8 „

Einwirkungsdauer in Stunden	Formoltitrierbarer N in mg je ccm		Zunahme in Proz. des nicht formoltitrierbaren Anfangs-N	
	u	g	u	g
0	0,146	0,146	0	0
24	0,166	0,154	0,64	0,26
48	0,274	0,184	4,14	1,23

Tabelle V.
Gelatineabbau durch Bac. mycoides.

Gesamtstickstoff: 3,27 mg je ccm

Bakterienzahl {Gesamt-: 145 Millionen je ccm; vermehrungsfähig in Proz. der Gesamtzahl {ungeschwächt: 31 Proz.; geschwächt: 1,2 „}}

Einwirkungsdauer in Stunden	Formoltitrierbarer N in mg je ccm		Zunahme in Proz. des nicht formoltitrierbaren Anfangs-N	
	u	g	u	g
0	0,187	0,187	0	0
24	0,200	0,193	0,42	0,19
48	0,242	0,238	1,78	1,65

Bei den Versuchen, deren Ergebnisse in den Tabellen III—V enthalten sind, erfolgte die Schwächung der Zellen durch halbstündige Behandlung mit Chloroform in Ruhe. Der Abbau der Gelatine wurde in einer 2½proz. Lösung derselben durchgeführt; den pH-Wert der letzteren von 5,7 beließen wir unverändert, da der gleiche Ansatz auch für Hefen Verwendung fand.

Der Abbau der Gelatine ist infolge des für die Bakterienproteinase ungünstigen pH-Wertes wohl nur gering, aber auch hier zeigt sich dieselbe Gesetzmäßigkeit wie beim Kaseinabbau, nämlich beim Bact. coli als Nichtverflüssiger ein stärkerer Abbau mit der geschwächten Population, bei Ps. fluorescens und Bac. mycoides als Verflüssiger das gegenteilige Verhalten.

6. Abbauversuche mit Gelatine und keimfreien Enzymlösungen.

Bei den bisher mitgeteilten Versuchen war immerhin mit der Möglichkeit zu rechnen, daß die Abnahme der proteolytischen Wirkung in der geschwächten Kultur bei den Verflüssigern auf den hemmenden Einfluß des Chloroforms auf die Proteinasen oder aber auf eine stärkere Zellvermehrung in der geschwächten Kultur gegenüber der ungeschwächten zurückzuführen ist, wenn auch bei dieser Annahme unverständlich bliebe, weshalb die Nichtverflüssiger nicht das gleiche Verhalten zeigen.

Es wurde daher in den folgenden Versuchen teils das Chloroform durch Absaugen im Vakuum entfernt und ferner eine Entkeimung der Bakteriensuspensionen mittels Göttinger Ultrafeinfilter vorgenommen. Die auf Nähragar in Roux-Flaschen herangewachsenen Bakterienrasen wurden mit physiologischer Kochsalzlösung abgespült — und zwar je Flasche mit 15 ccm —, in den vereinigten Suspensionen der Gesamtkeimgehalt nach der Hefemischmethode bestimmt und dann eine Vierteilung der Population vorgenommen. Zwei Teile erfuhren eine Chloroformbehandlung durch eine halbe Stunde, und zwar die eine in Ruhe (g), die andere unter Schütteln am Elektroapparat (g_1). Von den beiden ungeschwächten Vierteln wurde das eine ebenfalls geschüttelt (u_1), um den Einfluß des Schüttelns auf die Bakterien in der Parallelprobe auszuschalten. Aus den nicht geschüttelten Populationen erfolgte die Entfernung des Chloroforms durch Absaugen im Vakuum, worauf die Bakteriensuspensionen auf das gleiche Volumen des Gelatineansatzes zur Einwirkung kamen. Die geschüttelten Kulturen wurden mittels Göttinger Ultrafeinfilter entkeimt.

Der Gelatineansatz bestand aus einer 4proz. Gelatinelösung in einem Phosphatpuffergemisch vom pH = 7.

Wie aus den Tabellen VI und VII hervorgeht, hat weder die Entfernung des Chloroforms noch die Abtrennung der Bakterien durch Filtration an der beobachteten Gesetzmäßigkeit etwas zu ändern vermocht. Auch hier wieder bewirkte die Zellgrenzschädigung durch Chloroform eine relativ starke Zunahme der proteolytischen Wirkung der Nichtverflüssiger, während bei den Verflüssigern eine solche ausblieb bzw. eine schwache Abnahme zu beobachten war.

Tabelle VI.
Gelatineabbau durch Bact. coli und Ps. fluorescens.

Bakterienart	Gesamtzahl in Millionen je ccm (G)	Vermehrungsfahig		Abgebauter N innerhalb 24 Std. in mg N je 100 ccm		Differenz g—u
		in Millionen je ccm	in Proz. von G	u	g	
Bact. coli	5100	u 4200 g 5,5	u 82,3 g 0,18	6	13	+ 7
Pseudomonas fluorescens	5300	u 3800 g 0	u 71,7 g 0	14	13	— 1

Tabelle VII.
Gelatineabbau durch Filtrate der Suspensionen von Bact. coli und Pseudomonas fluorescens.

Bakterienart	Gesamtzahl in Millionen je ccm (G)	Vermehrungsfahig		Abgebauter N innerhalb 24 Std. in mg N je 100 ccm		Differenz g—u
		in Millionen je ccm	in Proz. von G	u_1	g_1	
Bact. coli	5100	u 3600 g 4	u 71 g 0,08	5	12	+ 7
Pseudomonas fluorescens	5300	u 4000 g 0	u 75,5 g 0	13	12	— 1

Wohl aber ergab sich mitunter ein andersartiges Verhalten, sofern die Bakterienernten mit physiologischer Kochsalzlosung gewaschen worden waren; diese Verhältnisse bedürfen noch der Klarung.

7. Die Relativzahl an nicht vermehrungsfähigen Zellen und die proteolytische Wirkung.

Für die Stärke der von einer Mikrobenpopulation ausgeübten proteolytischen Wirkung ist die Zahl jener Zellen maßgebend, die wirksame Enzyme austreten lassen. Nimmt man für die Verflüssiger sowie für die Nichtverflüssiger eine Abgabe der Proteinasen nur durch die nicht vermehrungsfähigen Zellen an, so ist die absolute Zahl an diesen für die Stärke der proteolytischen Wirkung allein maßgebend. Die Zahl der neben diesen vorhandenen vermehrungsfähigen Zellen ist vollständig belanglos. Wenn sich in einem bestimmten Volumen x tote Zellen vorfinden, deren Enzyme innerhalb einer bestimmten Zeit y mg Stickstoff abbauen, so ist die Wirkung die gleiche, ob x oder 100 x vermehrungsfähige Zellen zugegen sind, also die Prozentzahl der nicht vermehrungsfähigen Zellen 50 Proz. oder bloß 1 Proz. beträgt.

Eine Bezugnahme der proteolytischen Wirkung auf die Relativzahl an nicht vermehrungsfähigen Zellen ist nur dann statthaft, wenn die Gesamtzahl der Mikrobenzellen einer Population konstant gehalten wird. Das heißt demnach, daß die Frage der Enzymabgabe durch Mikroorganismen an wachsenden Kulturen derselben nicht geklärt werden kann. Und zwar auch deshalb nicht, weil die später entstehenden Zellen viel weniger Enzym bilden als die zuerst gewachsenen. Es wird demnach die Enzymwirkung durch die Enzymbildung überdeckt und hierdurch die Sachlage vollständig unentwirrbar. Aus diesem Grunde können auch die aus den Bakterienleibern einer wachsenden Kultur nach Toluolautolyse aufgefundene Enzymmengen absolut nichts über die Enzymabgabe aussagen.

Zusammenfassung.

1) Die Fähigkeit zur Gelatineverflüssigung steht mit der Sterblichkeit der Mikroorganismen und daher auch mit der Relativzahl an nicht vermehrungsfähigen Zellen in einer Population in keinem ursächlichen Zusammenhang. Die Verflüssiger sind demnach von den Nichtverflüssigern keineswegs durch ein rascheres Absterben unterschieden.

2) Verflüssiger und Nichtverflüssiger zeigen bezüglich ihrer proteolytischen Wirkung nach Grenzschichtschädigung durch Chloroform ein gegensätzliches Verhalten, gleichgültig, ob Kasein oder Gelatine als Substrat Verwendung findet, ob mit ruhenden Kulturen oder mit bakterienfreien Enzymfiltraten gearbeitet wird. Und zwar nimmt die proteolytische Wirkung durch die Schwächung mit Chloroform bei den Nichtverflüssigern zu, bei den Verflüssigern hingegen nicht.

3) Es hat demnach den Anschein, daß bei den Verflüssigern im Gegensatz zu den Nichtverflüssigern auch aus den vermehrungsfähigen Zellen Proteinasen austreten. Ob es sich hierbei um eine aktive Absonderung (Sezernierung) handelt, sei dahingestellt.

4) In wachsenden Kulturen läßt sich aus der Relativzahl der nicht vermehrungsfähigen Zellen ebensowenig wie aus der proteolytischen Wirkung der unter Toluolzusatz autolysierten Mikrobenleiber ein Schluß auf die Enzymabgabe durch die Zellen ziehen, da in der wachsenden Kultur die Enzymwirkung von der Enzymbildung überlagert wird. Für solche Untersuchungen sind nur Populationen geeignet, bei denen die Gesamtzahl der Zellen konstant gehalten werden kann.

Schrifttum.

1) v. Euler, H., Chemie der Enzyme. München 1927. — 2) Gorbach, G., u. Pirch, E., Enzymologia **1**, 191 (1936). — 3) Dies., Ebenda **2**, 92 (1937). — 4) Gorini, C., Worlds Dairy Congress 1928. — 5) Hahn, M., u. Spieckermann, A., in Lafar, Handb. d. techn. Mykologie, Bd. 3. Jena 1904—06. — 6) Janke, A., u. Holzer, H., Biochem. Z. **213**, 142 (1929). — 7) Dies., Ebenda **226**, 243 (1930). — 8) Janke, A., u. Zikes, H., Arbeitsmethoden der Mikrobiologie. Dresden u. Leipzig 1928. — 9) Kisch, B., Biochem. Z. **40**, 152 (1912). — 10) Moycho, W., C. r. Acad. Sci. Paris **201**, 859 (1935). — 11) Münchberg, F., Milchw. Forschgn **3**, 403 (1926). — 12) Oppenheimer, C., Die Fermente u. ihre Wirkungen, 2. Bd., S. 1130. Leipzig 1926; Suppl. S. 946. Den Haag 1937. — 13) Rettger, J. med. Res. **13**, 79 (1905). — 14) Virtanen, A. I., u. Suolahti, O., Enzymologia **2**, 89 (1937). — 15) Virtanen, A. I., u. Tarnanen, J., Z. physiol. Chem. **204**, 247 (1932).

17. Paraskevi Evangelinos (Athen, z. Zt. Berlin) u. T. Wohlfeil (Berlin):

Ueber Bakterienautolyse und deren Bedeutung für bakterielle Impfstoffe [1]).

Mit 1 Abbildung im Text.

Ueber die bakterielle Autolyse liegen eine Reihe älterer qualitativer Untersuchungen vor (siehe bei Kruse). An quantitativen Bestimmungen über die Größe und Geschwindigkeit der Autolyse sowie über die Bedeutung beschleunigender und hemmender Faktoren hat es bisher gefehlt.

1) Aus der Seuchenabteilung des Instituts Robert Koch, Berlin (Abteilungsleiter: Prof. Dr. T. Wohlfeil).

In neuerer Zeit untersuchte Dernby die Beziehungen zwischen der Autolysierfähigkeit bestimmter Bakterien und der Stärke ihres kollolytischen Vermögens. Er fand gewisse Uebereinstimmungen zwischen beiden Vorgängen und vertrat daraufhin die Theorie, daß es sich bei den bakteriellen Proteinasen vorwiegend um Fermente handele, die erst nach einer Autolyse der Bakterienzelle frei wurden. U. a. berichtete Haen über Autolyse von Pflanzenzellen und von Hefen sowie über die Folgerungen, die daraus für die Gärungsforschung gezogen werden konnten.

Problemstellung: Unsere eigenen Arbeiten über Autolyse erstreckten sich in dreierlei Richtungen. Wir haben uns zunächst bemüht, eine quantitative Methode zur Messung der Autolyse zu finden. Als uns das geglückt war, prüften wir die Abhängigkeit der Autolyse des Bact. proteus X 19 (0-Form) und des Bact. coli commune von einer Reihe chemischer und physikalisch-chemischer Faktoren.

Es ist wiederholt die Ansicht ausgesprochen worden (u. a. von Konrich), daß eine weitgehende Autolyse die antigene Wirksamkeit bakterieller Impfstoffe beeinträchtigen oder vernichten kann. Deswegen haben wir Untersuchungen darüber angestellt, in welchem Umfange die bakteriellen Impfstoffe autolytischen Prozessen unterliegen. Hierbei wurden bisher Typhus-, Paratyphus- und Choleraimpfstoffe geprüft.

Methodik: Folgende Methode erwies sich nach länger dauernden Vorversuchen als besonders zweckmäßig. Agarkulturen der zu untersuchenden Bakterien wurden durch dichte Papierfilter (Schleicher und Schüll Nr. 597) von ungelösten Partikelchen befreit und in einer gewöhnlichen Zentrifuge (bei 3000 Touren) 3mal mit 0,85proz. steriler Kochsalzlösung gewaschen. Von der wasserarmen Bakterienmasse haben wir meist 3 g auf 150 ccm der zu prüfenden Untersuchungsflüssigkeit aufgeschwemmt, luftdicht in 25 ccm große Zentrifugengläser abgefüllt und dieselben nach Paraffinieren 24—120 Std. bei 37° oder anderen Temperaturen bebrütet. Zwecks Prüfung der Autolyse wurden in jeder Untersuchungsserie 50 ccm der vorgenannten Bakterienaufschwemmung mit einer hochtourigen Zentrifuge bei 10000 Umdrehungen während einer Stunde ausgeschleudert. Bei höherem Gehalt an gelöstem Eiweiß in der Aufschwemmungsflüssigkeit war es erforderlich, die Lösungen wiederholt zu zentrifugieren oder sie zwecks Erniedrigung ihres spezifischen Gewichtes gegenüber den Bakterien 1 : 2 bis 1 : 4 mit Aqua dest. zu verdünnen. Von der für chemische Zwecke bakterienfreien Lösung sind je 5 ccm, bei den Impfstoffen je 25 ccm in dreifachen Analysen mittels des Mikro-Kjeldahlverfahrens auf gelösten Stickstoff geprüft worden. Da bei diesen hohen Tourenzahlen Zentrifugengefäße aus Glas fast immer zerbrechen, müssen glatt geschliffene Gefäße aus säure- und alkalibeständigem Kruppschen V2A-Stahl benutzt werden.

Eine Zunahme des gelösten Stickstoffes in der bakterienfreien Flüssigkeit war nach der obigen Methode als eine Vermehrung der durch Autolyse entstandenen löslichen Eiweißstoffe der Bakterienleiber zu deuten. Der Vorgang der Autolyse wurde weiterhin durch eine direkte Dunkelfeld-mikroskopische Auszählung der Bakterien (Peterfi, Blumenberg und Wienig, Wohlfeil) nach der von dem einen von uns ausgearbeiteten Zähltechnik überprüft und bestätigt. Die verwandten Bakterienaufschwemmungen hatten meist eine Dichte von 300—500 Milliarden Bakterien in 1,0 ccm.

Ergebnisse: In Bestätigung früherer Befunde ließen sich bei Proteusbazillen regelmäßig stärkere Grade der Autolyse finden als bei Bact. coli. Der Höhepunkt der chemisch nachweisbaren Autolyse lag in der Regel erst

nach mehrtägiger Bebrütung, meist nach 72—96 Std., nicht jedenfalls nach kürzerem Brutschrankaufenthalt. Die Bakterienzahlen nahmen im allgemeinen von Versuchsbeginn bis Versuchsende ab. Während eines Coliversuches bei 37° ließ sich z. B. nach 4tägiger Bebrütung eine Bakterienabnahme von 368 Milliarden in 1,0 ccm bis 188 Milliarden beobachten.

Im allgemeinen stand die Abnahme der Bakterienzahl und Zunahme des gelösten Stickstoffes in der bakterienfreien Flüssigkeit in umgekehrter Proportion zueinander. Die folgende Abbildung 1 zeigt das Ergebnis eines solchen Versuches in gepufferter 1/30 molarer Phosphatlösung. In weiteren Versuchen erwies sich die Menge des Autolysenstickstoffes nahezu direkt proportional der Menge der zu Versuchsbeginn aufgeschwemmten Bakterienmasse. Nahmen die Bakterienzahlen in der gleichen Aufschwemmungsflüssigkeit im Verhältnis von 1 : 2 : 4 : 8 zu, so vermehrten sich auch die gelösten Stickstoffmengen in ungefähr gleichem geometrischen Verhältnis.

Versuche mit verschiedenen Molaritäten, d. h. verschiedenem osmotischen Druck, der Phosphatpufferlösung, wobei 1/15, 1/30 und 1/60 m bei pH = 7,5 geprüft wurden, ergaben bei Bact. coli keine bedeutenden Unterschiede der Autolyse. Bei Bact. proteus war dagegen das Maximum der Autolyse meist bei hypotonischen Phosphatpufferlösungen, das Minimum bei hypertonischen Phosphatpufferlösungen gelegen.

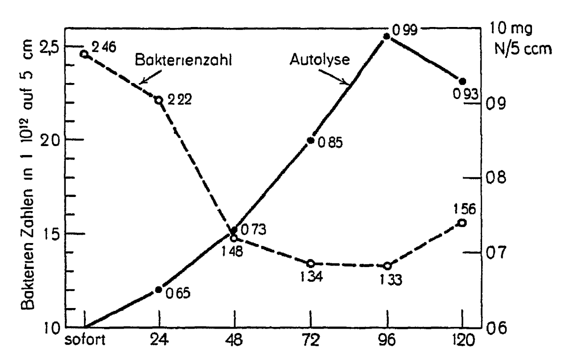


Abb. 1. Bacterium coli in 1/30 Phosphatpufferlosung pH 7,5. Jeder Punkt = Mittel aus 6 Bakterienzahlserien zu je 25 Zahlungen bzw. 9 N-Analysen.

Die Wasserstoffionenkonzentration hatte einen deutlichen Einfluß auf die Größe der Autolyse. Uebereinstimmend waren bei beiden Bakterienarten und bei beiden geprüften Pufferlösungen (Phosphat nach Sörensen; Borax-Kaliumbiphosphat nach Clark) die Autolysenwerte bei saurer Reaktion pH = 6,0 und 6,5 am niedrigsten. Sie stiegen bei neutraler Reaktion bereits merklich an und erreichten[1]) ihr Maximum bei einem pH von 8,0.

Wir haben weiterhin die Einwirkung verschiedener Anionen geprüft. Im allgemeinen fanden wir eine solche entsprechend der Gruppierung der Anionen nach der Hofmeisterschen Ionenreihe. In Tabelle I ist das Durchschnittsergebnis dieser Versuche aufgezeichnet. Alle Salze wurden als Natriumsalze in isotonischen 1/30 molaren, neutralen Lösungen geprüft. Entsprechend der von F. R. Hofmeister erstmalig beobachteten Beeinflussung der Quellung von organischen Kolloiden durch die obigen Anionen fanden wir, daß die stärkte Autolyse in den Anionenlösungen stattfand, die nach Hofmeister als quellungsvermindernd bzw. die Gelatinierung beschleunigend gefunden worden waren. Andererseits wirkten die in der Tabelle unten angeführten quellungserhöhenden Salze in dem Sinne, daß mit Ausnahme des Natriumjodids überall eine Verminderung der Autolyse eintrat. Die stärkste Autolyse war in Natriumazetat und Natriumzitratlösungen zu beobachten. Die geringsten autolytischen Prozesse ließen sich in dem Natriumrhodanid und

1) Höhere pH-Werte wurden bisher noch nicht gepruft.

Tabelle I.

Autolyse in 1/30 m neutralen Losungen der Hofmeisterschen Ionenreihe.

Verminderung der Quellung Beschleunigung der Gelatinierung	Bact. Proteus Autolyse N mg/5 ccm 24 Std. Mittel nach 96 Std. Einwirkung	Bact. coli Autolyse N mg/5 ccm 24 Std. Mittel nach 96 Std. Einwirkung
Natriumsulfat	0,34	0,32
Natriumtartrat	0,42	0,41
Natriumzitrat	0,45	0,54
Natriumazetat	0,62	0,49
Natrium-Kaliumphosphatpufferlosung	0,45	0,17
Erhohung der Quellung Verzogerung bzw. Verhütung der Gelatinierung		
Natriumchlorat	0,049	0,059
Natriumchlorid	0,38	0,3
Natriumnitrat	0,21	0,27
Natriumjodid	0,42!	0,395!
Natriumrhodanid	0,087	0,14

Natriumchloratlösungen feststellen. Man kann bei diesen letzteren Lösungen wegen des fast völligen Ausbleibens einer Autolyse während 5tägiger Bebrütung von einer Hemmungswirkung sprechen.

Wir haben entsprechend folgender Tabelle II die Autolyse bei verschiedenen Temperaturen geprüft und eine Zunahme derselben in einem Temperaturintervall von 4—45° gefunden. Bei 60° war zwar auch noch eine Autolyse vorhanden; aber es machte sich bereits eine Hemmungswirkung im Verhältnis zur Autolyse bei 45° bemerkbar. Das Maximum lag bei den geprüften Temperaturen zwischen 37° und 45°.

Tabelle II.

Temperaturkoeffizienten während einer 120 Std. Autolyse.

	Temperatur	4°	20°	37°	45°	60°
Bact. coli commune	Durchschnittliche Bakt.-Abnahme $1 \cdot 10^9$ in 5 ccm; je 10 Zählungen	keine Abnahme	—394	—628	—746	—349
	Durchschnittliche Zunahme der Autolyse; mg N in 5 ccm; je 15 Analysen	+ 0,039	+ 0,123	+ 0,86	+ 0,931	+ 0,84
	Temperaturkoeffizient der Autolyse für 10° C		←→ 7,0	←→ 7,5	←→ 1,6	←→ 0,95
Bact. proteus X 19 (O-Form)	Durchschnittliche Bakt.-Ab-Abnahme $1 \cdot 10^0$ in 5 ccm; je 10 Zählungen	—135	—330	—295	—775	—530
	Durchschnittliche Zunahme der Autolyse: mg N in 5 ccm; je 15 Analysen	+ 0,106	+ 0,176	+ 0,812	+ 1,162	+ 0,813
	Temperaturkoeffizient der Autolyse für 10° C		←→ 3,2	←→ 5,0	←→ 1,6	←→ 0,6

Aus den vorstehenden Durchschnittszahlen errechneten wir den Temperaturkoeffizienten der Autolyse für je 10° Temperaturdifferenz. Bei Bact. coli war ein wesentlich höherer Temperaturkoeffizient zwischen 4 und 37° festzustellen als bei Bact. proteus. Die Autolyse der Colibazillen wurde in diesem Temperaturintervall bei je 10° Temperaturerhöhung um das 7—7,5fache gesteigert, während die Autolyse der Proteusbazillen im gleichen Temperaturintervall nur um das 3—5fache vermehrt gefunden worden ist. Diese Unterschiede beweisen, daß Proteusbazillen schon bei sehr niedrigen Temperaturen hochgradig autolysieren und durch Anstieg der Temperatur nicht mehr in gleichem Maße wie der Colibazillus zu beeinflussen sind.

Eine Bestätigung hierfür ergab die Abnahme der Bakterienzahlen. Bact. coli zeigte bei einer Temperatur von 4° während 5tägiger Beobachtung keine meßbare Abnahme der Bakterienzahlen, während sich letztere bei Proteusbazillen um 135 Milliarden in 5,0 ccm verminderten. Bei höheren Temperaturunterschieden (37—45°) wurde die Autolyse bei beiden Bakterienarten nur noch um das 1,6fache beschleunigt, bei Temperaturen zwischen 45 und 60° sogar vermindert.

Aus diesen Ergebnissen lassen sich bereits für die Haltbarkeit bakterieller Impfstoffe in bezug auf die Autolyse prinzipielle Erkenntnisse ableiten. Es ist wünschenswert, auch schwer autolysierbare Bakterien, wie sie hier die Colibazillen oder die Bakterien der Typhus-Paratyphus-Gruppe darstellen, zwecks guter Konservierung bei tiefen Temperaturen von mindestens 4° aufzubewahren. Gerade sie erfahren schon bei Temperaturerhöhungen von 4—20° eine erhebliche Beschleunigung der Autolyse.

In der Praxis der Impfstoffkonservierung hat sich die Zugabe von Phenol nicht nur als ein wichtiges Mittel zur Erhaltung der Sterilität, sondern nach den folgenden Ergebnissen auch als Mittel zur Hemmung der Autolyse ergeben.

Wir prüften frisch hergestellte, Hitze abgetötete und Formalin abgetötete Phenol-konservierte Typhus- und Choleraimpfstoffe in 0,85proz. Kochsalzlösung während einer Zeit von 10 Wochen nach der Herstellung im Abstand von 14 Tagen auf Vorkommen einer Autolyse. Die Impfstoffe hatten im Verhältnis zu den obengenannten Versuchen nur eine geringe Dichte (8—12 Milliarden Bakterien in ccm). Sie wurden bei 4°, 20°, 37° und 60° luftdicht abgeschlossen aufbewahrt, so daß ein Verdunsten der Flüssigkeit nicht in Frage kam. Für die Analyse wurden wegen der geringen N-Mengen je 25 ccm bakterienfreie Aufschwemmungsflüssigkeit verascht.

Alle Typhusimpfstoffe, die mit 0,5 Proz. Phenol konserviert waren, zeigten während einer 10wöchigen Beobachtung keine merkliche Autolyse. Nur die Choleraimpfstoffe wiesen bereits während der vorgenannten Zeit eine deutliche Autolyse auf (Tab. III). Dabei war die Autolyse der formalinabgetöteten, phenol-konservierten Vakzinen wesentlich stärker als die der Hitze abgetöteten (1¼ Std. bei 56°) phenol-konservierten Impfstoffe. Die Autolyse der abgetöteten Bakterienaufschwemmungen stand prinzipiell nach dem Ausfall der Choleraversuche in gleichen Beziehungen zur Erhöhung der Aufbewahrungstemperatur wie die eingangs genannten Autolysenvorgänge bei lebenden Keimaufschwemmungen.

Schließlich haben wir ältere gebrauchsfertige Typhusimpfstoffe auf Autolysenstickstoff geprüft. Wir fanden bei Typhusimpfstoffen, daß die 1938 und 1937 hergestellten Impfstoffe ungefähr gleiche Anteile gelösten Stickstoffes in der bakterienfreien Aufschwemmungsflüssigkeit zeigten (Tab. IV). Nur der 1936 hergestellte Typhusimpfstoff hatte einen fortgeschritteneren

Tabelle III.

Art der Impfstoffe	Bakterienmengen	Zeit der Beobachtung; Zahl der Analysen	Analysenergebnis bei Versuchsbeginn	mg N in 25 ccm bakterienfreier Flüssigkeit			
				4°	20°	37°	60°
Mit 0,4 Proz. Formalinzusatz während 4 Tagen bei 22° abgetötete Choleraabschwemmungen in 0,85proz. Kochsalzlösung. Zur Konservierung vorwiegend mit 0,5 Proz. Phenol versetzt	In 1 ccm $8 \cdot 10^9$ im Dunkelfeld mikroskopisch gezählte Keime; auf 25 ccm der Analysenmenge, danach $200 \cdot 10^9$ Bakterien	1.—4. Woche nach Herstellung d. Impfstoffe; je 6 Analysen	1,24	1,32	1,4	1,64	1,34
			Veränderung, gegen Ausgangswert →	+ 0,08	+ 0,16	+ 0,4	+ 0,11
		Temperaturkoeffizient d. Autolyse für 10° C		←→ 4,0	←→ 3,6	←→ 0,96	
		6.—10. Woche nach Herstellung d. Impfstoffe; je 4 Analysen	1,24	1,37	1,52	1,76	1,45
			Veränderung gegen Ausgangswert →	+ 0,13	+ 0,28	+ 0,52	+ 0,21
		Temperaturkoeffizient d. Autolyse fur 10° C		←→ 4,04	←→ 2,42	←→ 0,95	

Grad der Autolyse erreicht. Bei Choleraimpfstoffen wurden schon bei den 1937 hergestellten Impfstoffen weit größere Autolysengrade gefunden als beim Typhus. Es standen uns für die Prüfung noch 2 besonders alte Choleraimpfstoffe von 1934 und 1933 zur Verfügung, die eine noch wesentlich höhere Autolyse aufwiesen. Phenolisierte Typhusimpfstoffe haben demnach vom Standpunkt der Autolyse mindestens eine Haltbarkeit von 2 Jahren.

Tabelle IV.

Art der Impfstoffe	Herstellungsdatum	Analytisch gefunden mg N in 25 ccm	mg N auf 1,0 ccm u. $1 \cdot 10^9$ Bakterien umgerechnet
Typhusimpfstoff $1^1/_4$ Std. bei 56° hitzeabgetötet. Keimzahl = $8{,}5 \cdot 10^9$ Bakterien/ccm	1936	0 74	$3{,}5 \cdot 10^{-3}$
	1937	0,46	$2{,}2 \cdot 10^{-3}$
	1938	0,44	$2{,}1 \cdot 10^{-3}$
Choleraimpfstoff 1 Std. bei 56° hitzeabgetötet. Keimzahl = $12{,}3 \cdot 10^9$ Bakterien/ccm	1933	2,72	$8{,}8 \cdot 10^{-3}$
	1934	1,89	$6{,}2 \cdot 10^{-3}$
	1937	1,47	$4{,}8 \cdot 10^{-3}$

Wir wollen über diese Ergebnisse der Beeinflußbarkeit der bakteriellen Autolyse durch physikalische und physikalisch-chemische Mittel zunächst noch keine Theorie aufstellen. Es bleibt die Frage offen, ob bei der Autolyse Fermente aus dem Gebiete der Proteinasen eine Rolle spielen, was durchaus wahrscheinlich ist, oder ob, insbesondere bei den durch Hitze oder Chemikalien stark beeinflußten bakteriellen Impfstoffen katalytische Prozesse unspezifischer Art eine allmähliche Auflösung der Bakterienzellen bewirken. Wir vermerken abschließend, daß noch andere Einwirkungen wie z. B. die Redoxpotentiale in der Aufschwemmungsflüssigkeit für den Ablauf der Autolyse von Bedeutung sein dürften. Mit deren Erforschung sind wir jedoch noch nicht so weit gekommen, daß wir an dieser Stelle darüber berichten können.

Abschließend ist zu vermerken, daß die beobachtete Zunahme der Autolyse bei bakteriellen Impfstoffen noch keineswegs einen direkten Rückschluß auf eine Aenderung der Wirksamkeit der Vakzinen zuläßt. Nach Erfahrungen, über die an anderer Stelle berichtet werden soll, ist eine Autolyse bakterieller Impfstoffe so lange für die Wirksamkeit derselben ohne Bedeutung, als keine Zerstörung des spezifischen Antigens eintritt. Die Bedingungen hierfür scheinen jedoch sehr kompliziert und nur zum Teil von der Autolyse abhängig zu sein.

18. K.-H. Meewes:

Neuere enzymatische Untersuchungen an technisch schädlichen Kleinlebewesen [1]).

Seit einiger Zeit begnügt man sich beim Studium des Mikrobenstoffwechsels nicht mehr mit der Feststellung der von den Kleinlebewesen erzeugten Stoffwechselprodukte, sondern richtet sein Augenmerk auf die Enzyme selbst, die von den Bakterien und Pilzen gebildet werden, sowie auf die Chemie der Zelle im allgemeinen. Diese Forschungen stehen noch am Anfang der Entwicklung. Sie brachten eine Umstellung der bisherigen Methodik mit sich insofern, als man hierbei nur mit chemisch genau definierten Nährsubstraten arbeiten darf und grundsätzlich auf Kulturen aus einer Zelle angewiesen ist.

Im folgenden sollen neuere Forschungsergebnisse mitgeteilt werden, wobei 2 Arbeiten über Mikrobenproteasen sowie über den Stickstoff- und Kohlenstoffstoffwechsel bei Schimmelpilzen besonders berücksichtigt werden. Diese Arbeiten wurden im Bakteriologischen Institut der Preußischen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft in Kiel von Flügge und Kreutzfeldt unter der Leitung von Prof. Dr. Lembke angefertigt.

Zu den Proteasen gehören bekanntlich jene Enzyme, welche Proteine und Aminosäurekomplexe zu hydrolysieren vermögen. Während die Proteinasen die nativen Eiweißkörper zerlegen, greifen die verschiedenen Peptidasen nur Peptide an. Ueber das Vorkommen und die Bedeutung dieser Enzyme bei Mikroben herrschte noch vor einigen Jahren in den bakteriologischen Lehrbüchern erhebliche Unklarheit. Heute ist man sich darüber klar, daß solche Enzyme sowohl bei der Autolyse der Zelle als auch bei der Ernährung der Mikroben mit Eiweißstoffen in Tätigkeit treten müssen. Mit Virtanen und Tarnanen (1) ist daher auch die Ansicht zu verwerfen, daß die Gelatine nicht verflüssigenden Bakterienarten keine proteolytischen Enzyme besitzen. Der gleiche Forscher stellte 1923 und 1929 mit Lundmark (2, 3) fest, daß ein typisches, Gelatine nicht verflüssigendes Bakterium, nämlich Bact. casei ε, Kasein und Gelatine spaltende Enzyme besitzt. Tarnanen (4) brachte das proteolytische Agens von Bact. casei durch Autolyse mit Glyzerin in Lösung und wies darin eine Proteinase, Polypeptidase und Dipeptidase nach. Virtanen und Tarnanen (5) konnten im Gegensatz

1) Aus dem Bakteriologischen Institut der Preußischen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Kiel (Direktor: Prof. Dr. A. Lembke).

zur herrschenden Ansicht den Beweis erbringen, daß z. B. Bact. fluorescens und B. subtilis Proteinasen sezernieren, und zwar zu etwa 99,5 Proz. Diese bewirkten Gelatineverflüssigung. Hieraus folgt, daß Bakterien ohne Gelatineverflüssigungsvermögen keine Proteinase ausscheiden. Graßmann und Schleich (6) konnten in einer nicht veröffentlichten Arbeit bei Aspergillus orycae eine Dipeptidase (Leucyl-Glycinspaltung bei pH 7,8), eine Aminopolypeptidase (Leucyl-Glycyl-Glycinspaltung bei pH 7,0) und eine Proteinase nachweisen. Lembke (7) erwies bei Oospora das Vorhandensein einer bei neutraler Reaktion wirksamen Polypeptidase und einer bei pH 5,5 wirksamen Proteinase. Es wurde ferner das Vorhandensein einer Dipeptidase wahrscheinlich gemacht. Johnson (8) fand bei Aspergillus parasiticus ein proteolytisches Enzym mit mindestens 4 Komponenten: eine Proteinase, eine Carboxypolipeptidase, eine Aminopolypeptidase und eine Dipeptidase. Berger, Johnson und Peterson (9) untersuchten den Gehalt an proteolytischen Enzymen bei ungefähr 30 Schimmelpilzen und fanden, daß das System mindestens eine Proteinase und wenigstens 5 Peptidasen enthielt, und zwar eine Dipeptidase, eine Aminopolypeptidase und 2 Enzyme, die Diglycin und Triglycin zu hydrolysieren vermögen. Die Verff. machten dabei die Feststellung. daß die einzelnen Komponenten des Enzymkomplexes bei den verschiedenen Stämmen in beträchtlich abweichenden Beträgen vorkommen. Im allgemeinen war die Enzymmenge bei den Aspergillen größer als bei den Penicillien. Der optimale pH für die Wirkung der Proteinase auf Gelatine lag bei ungefähr pH 7,0. Die Menge der gebildeten Enzyme war abhängig von dem Nährmedium und der Bebrütungsdauer; sie war am größten bei der Konidienbildung.

Nach den Feststellungen von Behr (10) ist Aspergillus niger zur Konidienbildung nur auf physiologisch alkalischen und nicht auf physiologisch sauren Nährböden befähigt. Es wurde aber nicht die Enzymwirkung bei physiologisch saurer Züchtung untersucht. Das Myzelgewicht soll bei alkalischer Züchtung bis zum 9. Tage zunehmen und von da ab zurückgehen. Auf physiologisch saurem Medium blieb das Myzelgewicht nach anfänglichem Steigen konstant.

Lembke und Flügge (11) schlossen in ihren Untersuchungen an die ebengenannten Ergebnisse an und untersuchten unter anderem die Frage, ob das auf physiologisch saurem Substrat gewachsene Myzel der Penicillien enzymarm ist. Besonderer Wert wurde jedoch auf die Erforschung der Zusammenhänge zwischen Enzymwirkung, Autolyse und Konidienbildung gelegt. Die Untersuchungen wurden an 13 Penicillienstämmen der Untergruppe Monoverticillium stricta, 7 der Untergruppe Monoverticillium ramigena und einen der Untergruppe Biverticillium symmetrica durchgeführt. Es wurde die physiologisch saure Nährlösung von Behr verwendet, in der das konidienfreie Myzel zur Zufriedenheit wuchs. Das Myzel wurde nach 10 Tagen geerntet, mehrmals gewaschen, gut ausgepreßt und alsdann im Trockenschrank nach Faust-Heim 12—20 Std. getrocknet und anschließend fein zermahlen. Aus dem Myzelpulver wurde die Enzymlösung durch Elution mit der 10fachen Menge Wassers gewonnen. Eine Isolierung und Reinigung der einzelnen Proteasen erfolgte nicht. Mit der so gewonnenen Enzymlösung setzten die Verff. Proteinasenbestimmungen bei Gelatine sowie Dipeptidasebestimmungen bei Leucylglycin an. Zur Erkennung der Enzymwirkung wurde die Zunahme des N_2-Volumens nach der van Slyke-Methode benutzt. Der N-Gehalt der Enzymlösung wurde mit der Mikrokjeldahl-Methode ermittelt. Der Gehalt an Eiweiß, Peptonen und Aminosäuren wurde durch die Differenz von Gesamt-N und NH_3-N (der ebenfalls mittels der Mikrokjeldahl-Methode

erfaßt wurde) als „Differenzstickstoff" gekennzeichnet. Das abzubauende Substrat sowie die Enzymlösung brachten Lembke und Flügge gemäß den Angaben von Johnson und Peterson gesondert auf pH = 7 und pufferten die Gelatine mit Sörensenschem Puffergemisch. Die Verff. stellten in Vorversuchen fest, daß das sofort nach der Ernte getrocknete Myzel im Gegensatz zu den Erfahrungen von Johnson und Mitarbeitern keine Proteinasewirkung zeigte. Diese trat erst ein, wenn das Myzel vor der Trocknung 48 Std. stehen blieb und hierbei gleichzeitig in Konidienbildung überging. Als günstigste Eluitionszeit ermittelten Lembke und Flügge eine solche von 2 Std. Bei Verwendung der doppelten Wassermenge sanken die Werte für den Differenz-N und den NH_3-N auf die Hälfte; die Enzymwirkung ging jedoch nicht in demselben Maße zurück. Wenn die Eluition bei schwach alkalischer Reaktion vorgenommen wurde, so stieg die Enzymwirkung an. Bei diesen Versuchen konnte festgestellt werden, daß die Eigenzersetzung der Enzymlösung geringfügig war und daher bei der Bestimmung der Enzymwirkung nicht berücksichtigt werden brauchte. Versuche, welche die Abhängigkeit der Enzymwirkung von der Reaktion verfolgten, ergaben in einem pH-Bereich von 2—7,5 schwankende Werte, die aber in der Nähe von pH 7 nicht beträchtlich waren. Die Verff. konnten im Gegensatz zu Johnson eine allgemeine Verminderung der Enzymwirkung als Folge der Trocknung nicht feststellen. Die von ihnen ermittelten Proteinasewerte ergaben bei Einhaltung der Versuchsmethode nur geringe Abweichungen. Die bisher genannten Versuche zeigten, daß die Enzymwirkung der auf physiologisch sauren Substraten gewachsenen Penicillien nur gering war. Die Erscheinung, daß sofort getrocknetes Myzel keine, das nach 2 Tagen getrocknete jedoch eine starke Enzymwirkung aufwies, veranlaßte die Verff., den zeitlichen Verlauf der Enzymzunahme in der lebenden Zelle zu untersuchen. Sie gingen dabei so vor, daß das in üblicher Weise gewonnene Myzel zunächst verschieden lange im Brutschrank bei 25° C aufbewahrt wurde. Von der 30. Stunde an konnte eine Autolyse der Myzellösung festgestellt werden, für die der Name „Trockenautolyse" geprägt wurde. Mit zunehmender „Trockenautolysezeit" nahm die $(H)^0$ einen höheren Wert an. Die Proteinasewerte stiegen im Verlaufe der Trockenautolyse zunächst an und hielten sich dann zwischen 18 und 60 Std. praktisch auf gleicher Höhe (1,03—1,13 ccm N_2). Erst nachdem eine deutliche Autolyse im Myzel vor sich ging, trat eine Proteinasewirkung auf. Von diesem Zeitpunkt an ging die Proteinasewirkung parallel mit der Autolyse. Es wird angenommen, daß die Proteinase den ersten Abbau des Myzeleiweiß, also die Autolyse einleitet. Als besonders auffällig war festzustellen, daß fast gleichzeitig mit der höchsten Proteinasewirkung eine Konidienbildung beobachtet wurde. Lembke und Flügge deuten diese Erscheinung so, daß die proteolytischen Enzyme das Myzeleiweiß in eine transportierbare Form überführen, die als Konidieneiweiß — bei hungerndem Myzel — abgelagert wird. Nach allem gelang es Lembke und Flügge also festzustellen, daß Proteinasewirkung (Autolyse) und Konidienbildung einander zeitlich folgen.

Nach weiteren Untersuchungen scheint es nicht ausgeschlossen, die Proteinasewerte des trockenautolysierten Myzels für die Bestimmung einzelner Spezies zu verwerten.

Eine Ergänzung zu der eben behandelten Arbeit von Lembke und Flügge geben die Untersuchungen von Lembke und Kreutzfeldt (12) über den Stickstoffhaushalt von Penicillium und gleichzeitig über den Kohlenstoffhaushalt. Durch Mikromanipulation gewonnene Einsporkulturen von Penicillium Thomii Maire wurden verschieden vorgezüchtet und ihre Gesamt-

bilanzen über den N- und C-Stoffwechsel aufgestellt. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, kamen nur synthetische Nährlösungen zur Anwendung. Als C-Quelle wurde Glukose, als N-Quelle KNO_3 bzw. $(NH_4)_2SO_4$ benutzt. Für die Aufstellung der N- und C-Bilanzen wurden folgende Bestimmungen durchgeführt:

Nitratbestimmung (durch Fällung mit Nitron), Ammoniakbestimmung (nach Kjeldahl), Bestimmung des N im Myzel (nach Kjeldahl), Gesamt-N-Bestimmung (nach Kjeldahl). C-Gehaltsbestimmung des Myzels (durch Elementaranalyse im Halbmikroautomaten nach Rheilen und Weinbrenner), Gesamt-C-Bestimmung des Substrates (nach der gleichen Methode), Bestimmung der flüchtigen C-Verbindungen (aus der Differenz der Ausgangsmenge und Menge C im Myzel und Substrat). Weiterhin wurden die Zwischenprodukte des C-Stoffwechsels aus der Differenz von Gesamt-C im Substrat und Glukose-C berechnet; ferner der Zucker (nach Bertrand) und der Wasserstoffgehalt des Myzels (durch Elementaranalyse). Der N- und C-Stoffwechsel wurde bei folgenden 5 Züchtungsmethoden untersucht:

1. Oberflächenzüchtung in physiologisch alkalischem Nährsubstrat.
2. Oberflächenzüchtung mit Luftbelüftung in physiologisch alkalischem Substrat.
3. Oberflächenzüchtung mit Sauerstoffbelüftung in physiologisch alkalischem Substrat.
4. Züchtung mit Durchlüftung des physiologisch alkalischen Substrates.
5. Oberflächenzüchtung in physiologisch saurem Substrat.

Es stellte sich heraus, daß bei der üblichen Oberflächenzüchtung infolge CO_2-Entwicklung eine baldige Entwicklungsstörung eintrat. Bei Entfernung des CO_2 durch Luft konnte dies vermieden werden. Sauerstoff hemmte die Myzelbildung. Wurde das Substrat mit strömender Luft behandelt, so konnte nur eine außerordentlich geringe Myzelausbeute erzielt werden. Die Züchtung in physiologisch saurer Nährlösung ergab größere Myzelausbeuten als solche in physiologisch alkalischen Substraten. Ammoniumsulfat erwies sich somit als bessere N-Quelle als Kaliumnitrat. Es war überraschend, daß bei den 5 verschiedenen Züchtungsarten das Myzel eine annähernd konstante spezifische Zusammensetzung aufwies. Es ergaben sich bei den 5 Züchtungsarten mit 39 Einzelzüchtungen folgende Durchschnittswerte: der N-Gehalt betrug annähernd 4,9 Proz., der C-Gehalt 49,5 Proz. und der H-Gehalt 7,2 Proz.

Schrifttum.

1) Virtanen, Sumaleinen Tiedeakademia, Helsinki, 1933. — 2) Virtanen, Soc. Sci., Comment. Fennica **1** (1923). — 3) Virtanen u. Lundmark, Milchw. Forschg **8** (1929). — 4) Tarnanen, Diss. Helsinki, 1930. — 5) Virtanen u. Tarnanen, Z. f. physiol. Chemie **204** (1931). — 6) Graßmann u. Schleich, Ergebnisse der Enzymforschung I. — 7) Lembke, Diss. Kiel, 1933. — 8) Johnson, Z. physiol. Chemie **224** (1934). — 9) Berger, Johnson u. Peterson, J. of biol. Chem. **117** (1936). — 10) Behr, Arch. f. Mikrobiologie **1** (1930). — 11) Lembke u. Flügge, Diss. Kiel, 1938. — 12) Lembke u. Kreutzfeldt, Diss. Kiel, 1938.

Aussprache.

H. Delitsch (Kiel):

Mit der Einteilung der Milchbakterien in Saccharolyten, Azidoproteolyten und gewöhnliche Proteolyten läßt sich praktisch nicht viel anfangen, da die Grenzen zu unscharf sind. Als Gorini diese Einteilung aufstellte, nahm er an, daß die echten Milchsäurebakterien als Vertreter der Saccharolyten keine proteolytischen Enzyme bilden. Heute gibt er zu, daß

dies doch der Fall ist. So gehört Streptobacterium casei Orla Jensen nach den Untersuchungen dieses Autors zweifellos zu den echten Milchsäurebakterien. Nachdem Wilhelm Meyer bei einigen Stämmen proteolytische Eigenschaften nachgewiesen hatte, wurden diese Stämme von Gorini zu den Azidoproteolyten gerechnet. Auch die Grenze gegen die gewöhnlichen Proteolyten ist unscharf. Dies zeigt sich z. B. daran, daß es nach Gorini eine „azidoproteolytische Rasse" von Bacillus subtilis geben soll.

Wegen dieser unklaren Abgrenzung des Begriffs „Azidoproteolyten" hat sich in der Praxis, besonders der Königsberger Schule (Grimmer), eine Begriffsverengerung herausgebildet. Man bezeichnet mit diesem Namen im engeren Sinne die säurelabbildenden Kokken. Diesen Kokken schrieb man früher eine große Bedeutung für die Käsereifung zu, man hat sie aber sicherlich stark überschätzt.

W. Hausam:

Maschmann erwähnte, daß die bisher nur bei Gasbrand nachgewiesenen Proteinasen die Umsatzprodukte des Kollagens spalten, ob dieses selbst, sei zwar zu vermuten, aber noch nicht nachgewiesen. In einer noch nicht abgeschlossenen Arbeit konnten Erreger aus der Gasbrandgruppe in Symbiose mit anderen Erregern beobachtet werden, die sterile, von Epidermis und Haar befreite Rinds- und Kalbshaut in 24—48 Std. restlos abbauen. Es ist dies bei langjährigen Arbeiten über die Flora der toten, vom Tier abgetrennten Haut, das erste Mal, daß Kollagen-abbauende Mikroorganismen nachgewiesen werden konnten. Von Interesse ist dabei, daß beim Beimpfen der Haarseite einer Haut (Haar und Epidermis nicht entfernt), die Organismen nur mangelhaft wuchsen und zum Abbau nicht befähigt waren; das gleiche ist der Fall bei Beimpfen des Unterhautbindegewebes der Haut. Möglicherweise sind dafür die Fettbestandteile des Unterhautbindegewebes bzw. der Keratingehalt von Epidermis und Haar verantwortlich zu machen. Es wäre erwünscht, wenn der Chemismus dieser Enzyme von Herrn Maschmann näher untersucht werden könnte.

H. Schmidt (Marburg a. L.):

Zum Vortrag E. Maschmann u. a.

Es hat zunächst nahe gelegen, die bekannte pathogene Wirkung der Gasödemerreger in Beziehung zu der Wirkung der Proteinasen und anderer Fermente zu bringen, und die antitoxische Wirkung der Gasödemsera in einer Antifermentwirkung zu sehen. Untersuchungen von Schultze in den Behringwerken zeigten jedoch, daß unabhängig von den genannten Fermenten noch echte Toxine von den Gasödembazillen gebildet werden, und daß zwar die Gasödemantisera eine gewisse Hemmungswirkung auf die Fermentwirkung zeigen. diese aber noch nicht mit genügender Sicherheit von der des Antitoxins getrennt werden konnte. Immerhin scheinen die noch nicht abgeschlossenen Versuche dafür zu sprechen, daß Antitoxin und Antifermentwirkung nicht identisch sind.

Zum Vortrag Evangelinos.

Diese interessanten und für alle, die mit der Herstellung von Impfstoffen beschäftigt sind, sehr wertvollen Angaben von Frl. Evangelinos betreffen zwar die Frage der Wirkung der Autolyse auf die Zahl noch nachweisbarer Keime in den Impfstoffen, aber nicht die Frage der Haltbarkeit derselben, denn solange eine Autolyse die antigenwirksamen Stoffe intakt läßt, kann von einer Verringerung der Haltbarkeit des Impfstoffes nur dann gesprochen werden, wenn darauf hingezielte Immunisierungsversuche dies festgestellt haben.

T. Wohlfeil (Berlin):

Zu den Vorträgen von Maschmann und Janke und der Bemerkung von H. Schmidt.

Zu meinem größten Interesse hat Herr Maschmann nun auch für anaerobe Bazillen, insbesondere Bac. histolyticus, in prinzipieller Uebereinstimmung mit meinen früheren Feststellungen bei Bact. proteus, Staphylokokken und Milzbrandbazillen festgestellt, daß bakterielle Proteasen im Krankheitsgeschehen des Organismus eine hochbedeutsame Rolle spielen.

Zu den Ausführungen des Herrn Janke habe ich hinzuzufügen, daß auch ich stets mit sehr dichten Bakteriensuspensionen bei allen Fermentversuchen gearbeitet habe, die als ruhende Suspension angesehen werden konnten, da bei der erheblichen Bakteriendichte ($100—500 \cdot 10^9$/ccm) eine echte Vermehrung nicht, höchstens nur ein Zerfall der zu Versuchsbeginn schon in Teilung befindlichen Mikroben beobachtet werden konnte. Die Einwände bestimmter Fermentforscher gegen die Brauchbarkeit lebender Bakterien bei Fermenversuchen sind bei Innehaltung obiger Voraussetzungen unbegründet.

Man muß bei der pathogenen Wirkung bakterieller Fermente streng unterscheiden zwischen ihrer Bedeutung beim Zustandekommen einer Infektion, wobei sie den sog. Aggressinen entsprechen und ihrer Bedeutung im weiteren Verlauf der Erkrankung. Eine

Infektion kommt unter diesen Gesichtspunkten im Tier- und Menschenkörper zustande, wenn sich die Fermentsysteme der pathogenen Bakterien im vollsten Aktivitätszustand befinden. Es ist demnach nicht erstaunlich, daß Bakterien aus dem infizierten Tierkörper infektionstüchtiger sind, da in der Regel bestimmte oder alle Fermentsysteme (Proteasen, Karbodehydrasen, Esterasen) einen höheren Aktivitätszustand besitzen als pathogene Bakterien aus alten Laboratoriumszuchten. Der Vortragende deutet kurz auf einige neuere Ergebnisse hin, die er bei Colistämmen aus Krankheitsprozessen und bei Staphylokokken gefunden hat und über welche an anderer Stelle ausführlich berichtet werden soll.

Zu den Ausführungen des Herrn Schmidt über den Vortrag von Frl. Evangelinos muß ich bemerken, daß Herr Schmidt uns mißverstanden hat. Es war unsere Absicht, die exakten theoretischen Grundlagen der Autolyse zu klären und darzulegen, daß auch bakterielle Impfstoffe quantitativ betrachtet erheblich autolysieren können bzw. durch bestimmte Chemikalien in ihrer Autolyse verzögert werden. Die Haltbarkeit der Impfstoffe hängt auch nach meinen Erfahrungen von der Autolyse nur insofern ab, als sie das antigene Vermögen unter bestimmten Umständen schädigen kann. Das ist jedoch keineswegs immer der Fall, wie ich vor einer Woche in einem Vortrage in Berlin bemerkt habe. Die Wirksamkeit autolysierter Typhusimpfstoffe läßt nach eigenen Erfahrungen bei Tierversuchen nur dann nach, wenn durch die Autolyse z. B. durch eine solche nach Formalinabtötung im Brutschrank bei 37°, das Vi-Antigen geschädigt worden ist.

Maschmann (Frankfurt/Main) Schlußwort

C. Gorini (Mailand) Schlußwort).

Danke sehr dem Kollegen Delitsch für seine Bemerkung. — Das stimmt ganz mit dem überein, was ich in meinem Vortrag betont habe, daß in der Biologie keine scharf getrennte Gruppe herzustellen ist.

Jedenfalls freut es mich sehr, auch aus dem Vortrag von Meewes zu konstatieren, daß nicht nur die Königsberger Schule, sondern auch die Kieler und die Weihenstephaner Schule die Notwendigkeit der bakteriellen Enzymologie anerkennen.

19. Gerhard Piekarski:

Lichtoptische und übermikroskopische Untersuchungen zum Problem des Bakterienzellkerns [1]).

Mit 1 Abbildung im Text und 1 Tafel.

Seit mehr als 3 Jahren bemühe ich mich mit allen neuen Forschungsmethoden die Frage zu klären, ob Bakterien einen Zellkern oder diesem homologe Gebilde besitzen, die als morphologische Grundlage für erbbiologische Vorgänge, wie wir sie bei höheren Tieren und Pflanzen in den Kernen und Chromosomen mit Sicherheit kennen, anzusprechen sind. Die Förderung dieser Frage ist deshalb von Bedeutung, weil sie zur Klärung mancher anderer praktischer und theoretischer bakteriologischer Probleme beitragen kann. Es sei daran erinnert, daß Jollos (1924) auf Grund seiner Untersuchungen an Ziliaten zu der Auffassung gelangte, daß Umstimmungen bei Bakterien in der Regel als sog. Dauermodifikationen anzusehen seien. Hierher gehören also Fragen wie die nach der Natur von Virulenzänderungen, Umschlag pathogener Stämme in apathogene und umgekehrt, Verträglichkeit und Gewöhnung an Pharmaka in der Chemotherapie u. a. Durch Jollos und seine anscheinend etwas einseitige Betrachtungsweise der Umstimmungen bei Bakterien und

---

1) Aus dem Erbwissenschaftlichen Forschungsinstitut des Reichsgesundheitsamtes, Berlin-Dahlem (Leiter: Prof. Dr. G. Just).

Protozoen (vgl. die Arbeiten von Jennings und seinen Schülern) ist die Berücksichtigung der Möglichkeit mutativer Veränderungen etwas in den Hintergrund geraten, zumal Zellkerne und chromosomale Strukturen bei Bakterien bisher nicht mit Sicherheit bekannt sind. Jollos sagte damals: „Ebensowenig wie von einer Sexualität wissen wir ja bei den Bakterien irgendetwas von Chromosomen oder anologen Kernstrukturen, ist doch selbst die Frage des Vorhandenseins oder Fehlens überhaupt von Kernen .... noch mehr als umstritten. Ist unter solchen Umständen an das Vorhandensein von Genen zu denken, eine Unterscheidung von Genotypus und Phänotypus denn überhaupt möglich und berechtigt?“ Jollos bestreitet zwar nicht völlig die Möglichkeit der Entstehung von Mutationen bei Bakterien, betont aber, daß wegen der bisher unbekannten Sexualitätserscheinungen der Begriff „Mutation aus der bakteriologischen Literatur völlig verschwinden“ müsse. Die Berechtigung zu dieser — man kann vielleicht sagen — dogmatischen Einstellung würde durch den sicheren Nachweis eines Kerns oder kernähnlicher Strukturen wesentlich geringer, und man müßte wohl in gleichem Maße mit Mutationen wie mit Dauermodifikationen rechnen; denn allein die Tatsache, daß das Fehlen von Sexualitätserscheinungen eine Prüfung über die Natur der Veränderungen nicht ermöglicht, genügt nicht, um die oben zitierte Auffassung zu rechtfertigen.

Wenn man bis vor wenigen Jahren trotz sehr häufiger Bemühungen, das Zellkernproblem bei Bakterien zu lösen, keinen eindeutigen Nachweis für die Existenz eines Kerns erbringen konnte, dann lag dieser Umstand an dem Fehlen eines spezifischen Kernfärbemittels. Die im allgemeinen in der Bakteriologie üblichen Farbstoffe sind für spezifische Kernfärbungen nicht geeignet.

Vor etwa 12 Jahren entdeckte nun Feulgen, daß ein regelmäßiger Bestandteil des Zellkerns bei Pflanzen und Tieren, die Thymonukleinsäure, nach Hydrolyse in normaler Salzsäure mit fuchsinschwefliger Säure die Aldehydreaktion gibt. Es werden bei der Hydrolyse Purinkörper aus dem Verband der Thymonukleinsäure getrennt und Gruppen frei, die sich wie echte Aldehyde verhalten. Der Zellkern färbt sich dabei rotviolett. Diese Reaktion — richtig angewendet — färbt nur den Zellkern, insbesondere die Chromosomen; das Zellplasma bleibt so gut wie ungefärbt.

Es lag nun nahe, diese typische Kernfärbung, die also keine Färbung im üblichen Sinne, sondern das Ergebnis einer mikrochemischen Reaktion darstellt, bei Bakterien zu versuchen (Stille 1937, Piekarski 1937). Dabei zeigte sich nun folgendes:

Untersucht man junge Bakterienkulturen von nicht sporenbildenden Bakterien — höchstens 18—24 Std. alt —, dann findet man in den Zellen regelmäßig 2 nahe den Zellenden gelegene nuklealpositive — d. h. auf die Feulgensche Reaktion ansprechende — Körper, die sich — wie man aus den Abbildungen schließen darf — stets vor der Zelldurchschnürung teilen — sich also selbständig teilen und nicht durchgeschnürt werden (Tafelabb. 1). Die von mir zuerst bei Paratyphus- und Colibakterien beobachteten zytologischen Verhältnisse (Piekarski 1937) sind auch bei Prodigiosus-, Proteus- und Pyozyaneusbakterien in gleicher Ausbildung anzutreffen. Prüft man ältere Kulturen — etwa ab 24 Std. — dann findet man zuerst wenige, später ausschließlich kleinere Bakterien, die sich von den ersten — die ich zur leichteren Verständigung als primäre bezeichne — dadurch wesentlich unterscheiden, daß sie nur einen zentral gelegenen Körper tragen. Diese Zellform bezeichne ich im Gegensatz zur primären als sekundäre (Tafelabb. 3a).

Daß beide Formen nur Modifikationen ein und derselben Art, desselben Stammes sind, soll eine Photoserie beweisen (Tafelabb. 2 A). Sie ist auf folgende Weise entstanden: Eine Deckglaskultur nach Fortner wurde von einer etwa 48-Stunden-Kultur, die ausschließlich sekundäre Formen enthielt, beimpft. Eine bestimmte Impfstelle wurde dann in Abständen, die sich aus der Beobachtung der wachsenden Zellen ergaben, photographiert und vom gleichen Material, das gleichzeitig auf Platten geimpft wurde, in gleichen Abständen Klatschpräparate zur Färbung angefertigt. So erhielt man vergleichbare Bilder, durch die man sich Aufschluß über die jeweiligen zytologischen Verhältnisse in den Bakterien verschaffen konnte (Tafelabb. 2 B). Danach dürfte es als sicher gelten, daß die aufgeimpften Zellen (10^{30}) sämtlich als sekundäre Formen einen zentral gelegenen Körper besitzen. Dieser teilt sich offenbar, so daß um 13^{00} die Zellen je 2 Feulgen-positive Körper enthalten. Diese teilen sich dann beide zu gleicher Zeit und alle folgenden Zellen besitzen weiterhin die beiden Zelleinschlüsse bis zum erneuten Uebergang zur Sekundärform.

Sehr klar zeigen zwei weitere Abbildungen von Bact. prodigiosum die beiden Formen. Abb. 3 a der Tafel stammt von einer Schrägagarkultur, die vor etwa 3 Monaten beimpft und dann zugeschmolzen wurde. Dieses Material impfte ich auf eine frische Agarplatte und machte nach 2 Std. (bei 25° C) ein Klatschpräparat (Tafelabb. 3 b). Die beiden Photographien sind nach mit Karminessigsäure gefärbten Präparaten angefertigt worden. In Tafelabb. 3 a haben wir neben einigen abgestorbenen Formen (siehe weiter unten) ausschließlich sekundäre Zellen, während schon nach 2 Std. einige sekundäre Formen zu primären geworden sind, die sich mit K.E.S. färben, ohne die Innenstruktur erkennen zu lassen. Aus diesen Abbildungsserien geht wohl eindeutig hervor, daß die primären Formen aus den sekundären entstehen.

Bei Betrachtung der einzelnen Zellen der Photoserie (z. B. unterste Zelle der Abb. 2 A a, b, c, d der Tafel) hat man den Eindruck, daß die mit der Nukleal-reaktion darstellbaren Körper auch im lebenden Zustand zu erkennen sind. Diese Beobachtung stimmt aber nicht. Wie ein Vergleich mit den gefärbten Präparaten zeigt, verändern sich die polständigen, dunklen Strukturen nicht im Verlauf des Zellwachstums, wie das auf Grund der Feulgenpräparate zu erwarten wäre. Ferner liegen die Einschlüsse innerhalb der Zelle nicht polständig, wie die Photographien im ultravioletten Licht, die die wirkliche Lage der Körper in der lebenden Zelle zeigen, ergeben (Piekarski 1938). Schließlich entstehen die dunklen Körper an den Zellenden ganz neu in der Mitte der Zelle. Allem Anschein nach stehen sie im Zusammenhang mit der Zellteilung und Ausbildung der neuen Zellenden. Typisch für sie ist, daß sie in der Mitte der Zelle an der Stelle der eigentlichen Zelldurchschnürung als Neubildung auftreten, zuerst unpaar sind, sich teilen und schließlich in die neuen Zellenden aufgehen.

Während die Entstehung der primären Zellen aus den sekundären durch die Photoserien zu beweisen war, konnte die Art der Umwandlung der primären in sekundäre Formen noch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Als möglich sind zwei Wege anzusehen:

Entweder die primäre Zelle teilt sich unter bestimmten Verhältnissen und wird zu zwei sekundären; oder die beiden Körper der primären Zelle verschmelzen zu einem zentralen der sekundären Form. Diese Frage endgültig zu beantworten, war mir bisher nicht möglich. Ich versuchte durch Serienaufnahmen Aufschluß zu erhalten und habe den Eindruck gewonnen, daß die erste der beiden Möglichkeiten verwirklicht ist; aber ein klares Ergebnis

war nicht zu erlangen. Ich hoffe, mit zeitgerafften Filmaufnahmen die Frage endgültig beantworten zu können.

Gleichzeitig und unabhängig von meinen Arbeiten wurde von B. Stille in Göttingen an verschiedenen sporenbildenden Bakterien der gleiche Versuch eines Kernnachweises unternommen. Stille kam zu denselben Resultaten — nur abgewandelt für den Fall der Sporenbildner. Auch hier besteht die gleiche Anordnung der Feulgen-positiven Körper. Interessant ist bei diesen Bakterien, daß bei der Sporenbildung nur einer der beiden Körper in die Spore eingeht, während der andere zugrunde geht. Diese Tatsache gibt vielleicht einen Hinweis für das Verhalten der Zelleinschlüsse bei der Entstehung der sekundären Zellform. Danach hat eine Verschmelzung der beiden Körper beim Uebergang in die Sekundärform sehr wenig Wahrscheinlichkeit für sich. Es muß aber noch versucht werden, diese Vermutung zu beweisen.

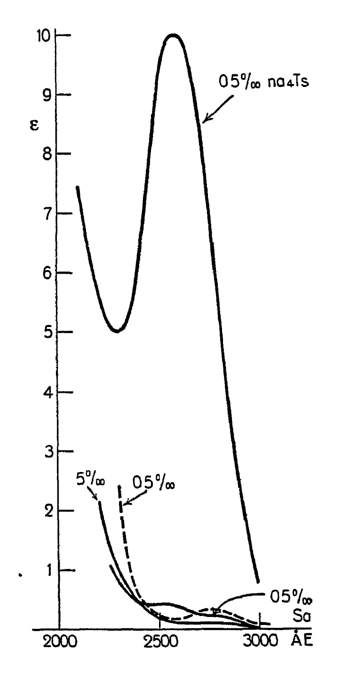


Abb. 1. Graphische Darstellung der Absorptionsverhältnisse von Thymonukleinsäure im ultravioletten Licht verschiedener Wellenlänge (Maximum bei 260 mμ) im Vergleich zur Absorption von Eiweißsubstanzen gleicher Konzentration (untere kleine Kurven). Absorptionskurven von 0,5 ‰ Natriumthymonukleat, 0,5 ‰ Serumalbumin (gestrichelt), 5 ‰ Protaminsulfat und 0,5 ‰ Histonsulfat. (Aus Caspersson 1936.)

Weiterhin hat Caspersson in den letzten Jahren auf Grund eingehender Untersuchungen über die Chemie des Zellkerns festgestellt, daß die Thymonukleinsäure ultraviolettes Licht von 0,260 μ Wellenlänge stark absorbiert (Abb. 1). Von dieser Erkenntnis ausgehend photographierten wir verschiedene Bakterien im kurzwelligen ultravioletten Licht und konnten in günstigen Fällen die Feulgen-positiven Strukturen darstellen (Piekarski 1938). Bei den sog. Primärformen der nicht sporenbildenden Bakterien gelang die Darstellung der nuklealpositiven Körper nur in seltenen Fällen. Dagegen ließen sich — wie meine letzten Untersuchungen ergaben — die Feulgen-positiven Elemente in den sog. Sekundärformen durch die ultraviolette Absorption sehr gut abbilden. Dieses eigenartige Verhalten geht parallel mit der Beobachtung, daß sich die beiden Formen auch durch ihre Färbbarkeit mit Karminessigsäure unterscheiden lassen (siehe unten und vergl. Tafelabb. 3). Es wurde schon früher vermutet, daß die Ursache für diese unterschiedliche Färbbarkeit auf eine verschiedene Struktur der Zellhülle zurückzuführen ist (Piekarski 1937, S. 435). Die Ultraviolett-Untersuchungen führen zu der gleichen Annahme. Eine Möglichkeit zur Erklärung der eigenartigen Absorptionsverhältnisse im ultravioletten Licht bietet vielleicht die Beobachtung, daß die Sporen der Bakterien eine ungewöhnlich hohe Ultraviolett-Absorption besitzen. Diese muß auf einen besonderen Chemismus der Sporenmembran zurückgeführt werden. Es besteht nun die Möglichkeit, daß die Hülle der „jugendlichen" Bakterienformen eine ähnliche chemische Beschaffenheit und damit relativ starke Ultraviolett-Absorption besitzt wie die Spore, eine Absorption, die stärker ist als die der Feulgen-positiven Strukturen, und infolgedessen diese nicht in Erscheinung treten läßt.

Mit diesem Ergebnis war ein weiterer Anhaltspunkt dafür gewonnen, daß die Zelleinschlüsse der Bakterien tatsächlich Thymonukleinsäure enthalten. Diese Beobachtungen und weiterhin die hohe Wahrscheinlichkeit, daß die Körper auch Teilungsvermögen besitzen, lassen auf eine weitgehende chemische und biologische Kernähnlichkeit schließen. Da aber die für die Zellteilung charakteristischen Chromosomen nicht festgestellt werden konnten, und um zu verhindern, daß man sie mit Zellkernen gleichstellt, habe ich sie vorläufig als kernähnliche Strukturen (Nukleoide) bezeichnet.

Erwähnt sei noch, daß die kernähnlichen Strukturen auch noch mit zwei anderen Färbeverfahren darzustellen sind:

1. mit Karminessigsäure (K.E.S.)
2. mit dem Giemsafarbstoff.

Von diesen beiden besitzt die K.E.S. eine gewisse Spezifität für Kernsubstanz. Bei den Bakterien gelingt es mit ihr aber nur die Zelleinschlüsse der sekundären Form darzustellen. Die primären Zellen färben sich homogen rot (Tafelabb. 3a u. b). (Außerdem kann man, wie es scheint, mit ihr in gewissen Grenzen abgestorbene von den lebensfähigen Bakterien unterscheiden; diese färben sich so gut wie gar nicht. Ueber genaue Einzelheiten soll gesondert berichtet werden.) Die homogene Färbbarkeit der primären Zellen hängt allem Anschein nach damit zusammen, daß der Farbstoff die Zellhülle färbt und nicht in die Zelle einzudringen vermag. Lockert man die Zellmembran — Membran, cum grano salis — mit Salzsäure auf, dann erhält man die gleichen Bilder wie bei der Nuklealreaktion.

Daß die Salzsäure aber keine Kunstprodukte erzeugt, konnte mit dem zweiten Färbeverfahren bewiesen werden. Mit dem Giemsa-Farbgemisch kann man einmal wie mit K.E.S. nach vorheriger Salzsäurebehandlung die Feulgen-positiven Strukturen darstellen, dann aber auch ohne Salzsäure durch kräftige Färbung und anschließende Differenzierung mit 1proz. Eosinlösung. In keinem Falle ließ sich ein Anhaltspunkt für die von Pietschmann und Rippel vertretene Auffassung finden, nach der die Kernsubstanz in der Bakterienzelle diffus verteilt ist und eine zeitweilige Entmischung unter Ausbildung eines kernähnlichen Körpers erfährt.

Die oben beschriebenen Strukturen lassen sich in allen von mir untersuchten Bakterienstämmen beobachten. Außer bei den schon genannten Arten wurden sie auch bei den Sarzinen als zentral gelegene Körper in jeder einzelnen Zelle eines „Pakets" gefunden. Sie sind in allen Zellen einer jungen, voll lebensfähigen Kultur anzutreffen. Wegen ihrer Kleinheit läßt sich aber über ihre wahre Gestalt und den Teilungsmodus nichts mehr aussagen.

Die gewöhnliche Optik unserer Mikroskope reicht nicht aus, um von den sog. Nukleoiden mehr zu sehen als ein winziges punktförmiges Gebilde. Es war deshalb mein Bestreben, die kernähnlichen Strukturen aufzulockern oder optisch aufzulösen. Es eröffneten sich dazu zwei Wege:

1. Vergrößerung des Objektes durch Quellung der Zellen.
2. Verwendung von optischen Geräten, deren Auflösungsvermögen über das des gewöhnlichen Lichtmikroskops hinausgeht.

Auf den ersten Weg wies mich seinerzeit zu Beginn meiner Untersuchungen Herr Prof. Seiffert. Man kann nämlich verschiedene Bakterien durch Zusatz von LiCl oder $MgCl_2$ zum Nährboden zur Quellung bringen und sie volumenmäßig um ein Vielfaches vergrößern. Mit der K.E.S. und Nuklealreaktion ließen sich bei den Versuchen tatsächlich vergrößerte und in der Form veränderte Zelleinschlüsse feststellen. Ich hatte diese experimentellen zytologischen Untersuchungen aber vorläufig aufgegeben, um dem Einwand

zu entgehen, geschädigte Zellen studiert zu haben. Jetzt aber, nach Abschluß der zytologischen Untersuchungen an den normalen Zellen, habe ich diese Versuche erneut aufgenommen. Wie die Tafelabb. 4 zeigt, sieht man verschiedene Zellen, die sich offenbar gerade teilen und im Inneren Strukturen erkennen lassen, die keineswegs nur punktförmig sind, sondern V-förmige Elemente enthalten, die wiederum Feulgen-positiv und sicher identisch sind mit den kernähnlichen Strukturen. Die Zellen, in denen — in der Abbildung mit K.E.S. gefärbte — Zelleinschlüsse zu sehen sind, entsprechen wieder den sekundären Formen. Da die Untersuchungen noch nicht abgeschlossen worden sind, lassen sich endgültige Aussagen noch nicht machen.

Für den zweiten Weg, der Verwendung von optischen Geräten mit hohem Auflösungsvermögen, ergaben sich zwei Möglichkeiten:

1. Das Ultraviolett-Mikroskop.
2. Das Uebermikroskop (Elektronenmikroskop).

Das Auflösungsvermögen der mikroskopischen Objektive ist abhängig von der Wellenlänge des verwendeten Lichtes. Je kürzer die Wellenlänge, desto höher das Auflösungsvermögen. Deshalb führte A. Köhler (1904) das kurzwellige ultraviolette Licht in die Mikroskopie ein. In Verbindung mit einer hochwertigen Quarzoptik erreichte er eine doppelt so hohe Auflösung mit ultraviolettem Licht als mit dem gewöhnlichen sichtbaren Licht. Allein auch diese Verbesserung brachte uns nicht weiter. Sie ließ an den Nukleoiden nicht mehr erkennen, als die Beobachtung mit sichtbarem Licht vermittelte. Der große Wert der ultravioletten Strahlen liegt, worauf schon oben hingewiesen wurde, eben in ihrer Eigenschaft, von der Kernsubstanz absorbiert zu werden. Demgegenüber verliert die Erhöhung des Auflösungsvermögens an Bedeutung.

Um auch die letzten optischen Möglichkeiten, eine Auflösung der Nukleoide zu erreichen, auszuschöpfen, versuchte ich mit H. Ruska, die Bakterien im Uebermikroskop von E. Ruska und v. Borries im Laboratorium für Elektronenoptik der Siemens u. Halske A.G. zu untersuchen. Das von uns verwendete Uebermikroskop baut auf der Erkenntnis auf, daß besonders geformte magnetische Felder, sog. magnetische Linsen, einen Elektronenstrahl ähnlich beeinflussen, wie optische Linsen das Licht. Wesentlich ist dabei, das den Elektronen Wellen von sehr geringer Länge zugeordnet sind. Diese äußerst kurze Wellenlänge bewirkt ein Auflösungsvermögen, daß heute schon praktisch 10mal größer ist als das des Ultraviolett-Mikroskops. Es können also noch zwei Punkte getrennt abgebildet werden, wenn sie einen Abstand von 0,01 μ haben. (Genaue Daten sind bei B. v. Borries u. E. Ruska 1939 zu finden; s. auch Piekarski u. H. Ruska 1939.)

Bei den übermikroskopischen Untersuchungen ergab sich, daß Zellen aus jungen Kulturen für die Elektronen so gut wie „undurchstrahlbar“ erscheinen. In der Tafelabb. 5 von Zellen einer jungen Proteuskultur sind keine Strukturen zu sehen, die mit den Nukleoiden in Zusammenhang zu bringen wären. Hier zeigt sich eine Eigenart der Elektronenstrahlen: Die Objekte müssen äußerst dünn sein, weil die Elektronen durch dickere Objektteile so stark abgelenkt werden, daß sie nicht mehr zur Bildentstehung beitragen.

Und noch eine zweite Eigenschaft der Elektronenstrahlen muß hier erwähnt werden: es werden Massendickeunterschiede[1]) dargestellt. Besitzen die kernähnlichen Strukturen die gleiche Massendicke wie das Zellplasma, dann kann man beide Zellteile elektronenoptisch nicht voneinander trennen,

1) Massendicke = Dicke × Dichte des Objekts.

nicht differenziert abbilden, wenn nicht präparative Verfahren angewendet werden, die die Gleichheit der Massendicke aufheben.

Ohne hier näher auf Einzelheiten einzugehen, sei mitgeteilt, daß es uns in meist älteren Kulturen gelungen ist, einzelne Zellen mit Nukleoiden aufzufinden. Tafelabb. 6 zeigt eine Pyozyaneuszelle, die im Begriff steht, sich zu teilen. Es sind schon die 4 Nukleoide durch Teilung entstanden und die neue Zellwand zwischen je zwei von ihnen fast ausgebildet. Die Zelle stellt also eine typische Primärform dar. Eine Sekundärform von Proteus, offenbar auch in Teilung, zeigt Tafelabb. 7. In den gleichen Zusammenhang gehören wohl auch die Zellen von Bact. coli, die schon früher von v. Borries, E. u. H. Ruska (1938) veröffentlicht worden sind (Tafelabb. 8).

Ganz allgemein mußten wir aber feststellen, daß sich bei der übermikroskopischen Untersuchung die kernähnlichen Strukturen selbst nur in seltenen Fällen klar darstellen ließen. Wenn aber eine Struktur überhaupt abgebildet wurde, zeigten sich in der Regel bei den Formen aus jungen Kulturen 2 an den Zellenden liegende dichtere Massenzentren, bei den Zellen aus älteren Kulturen eine zentral gelegene dichtere Struktur bei gleichzeitig aufgehellten Zellenden (Tafelabb. 9, 10), eine strukturelle Differenzierung, die nach unserer Auffassung die Befunde mit der Nuklealreaktion und dem ultravioletten Licht bestätigt.

Zum Schluß kehren wir zu unserer Ausgangsfrage zurück. Haben wir nun in diesen auf die verschiedenste Art nachgewiesenen und dargestellten kernähnlichen Strukturen die Erbträger der Bakterienzelle zu erblicken? Kann man die Nukleoide als Kernäquivalente ansprechen? Einen eindeutigen Beweis würden Sexualitätserscheinungen erbringen können. Aber mit dieser Beweismöglichkeit können wir zunächst nicht rechnen. Es bleibt somit nur der eine Weg, zu versuchen, durch Vergleich mit spezifischen Eigenschaften der Erbträger der höheren Tiere und Pflanzen sehr wahrscheinlich zu machen, daß die kernähnlichen Strukturen den Zellkernen homolog sind.

Wesentliche Kriterien wären danach:

1. Zu jeder von uns untersuchten Bakterienzelle gehört wenigstens ein Nukleoid, genau so wie zu jeder Tier- oder Pflanzenzelle ein Zellkern.

2. Die Nukleoide besitzen offenbar Teilungsvermögen. Sie teilen sich wie Zellkerne schon vor der Zellteilung.

3. Auf Grund der positiven Nuklealreaktion und der Absorption des ultravioletten Lichtes von 0,275 μ Wellenlänge dürfte gesichert sein, daß die kernähnlichen Strukturen Thymonukleinsäure und damit wenigstens auch einen regelmäßigen Bestandteil der Tier- und Pflanzenkerne besitzen. Hinzu kommt die Darstellbarkeit der Strukturen mit K.E.S., was allerdings keine so entscheidende Bedeutung zu haben braucht.

Die Befunde zu Punkt 3 — das soll nochmals betont werden — sagen natürlich nur: die kernähnlichen Strukturen enthalten Thymonukleinsäure. Nun ist diese Säure zwar nicht mit den Erbträgern oder gar den Erbeinheiten selbst gleichzusetzen. Sie ist aber nach unseren Erfahrungen ein regelmäßiger Begleitstoff der Gene. Ist sie in einer Zelle des Tier- und Pflanzenreiches nur an einer bestimmten Stelle anzutreffen, dann im Zellkern, bzw. in den einzelnen Chromosomen. Läßt sie sich aber außerhalb des Zellkerns nachweisen (z. B. im Blepharoplast der Trypanosomen), dann auch noch im Zellkern. Da in den Bakterien außer den Nukleoiden keine weiteren thymonukleinsäurehaltigen Strukturen zu finden sind, darf man annehmen, daß die kernähnlichen Strukturen als einzige Feulgen-positive Elemente der Bakterienzelle die gleiche Aufgabe haben wie die Zellkerne und auch hier

die Thymonukleinsäure offenbar in einer gesetzmäßigen Beziehung zu bestimmten morphologischen Trägern von Vererbungsvorgängen steht[1]). Alle die genannten Kriterien sprechen meines Erachtens in starkem Maße für die Berechtigung, die Nukleoide als die den morphogenetischen Prozessen zugrunde liegenden Erbelemente der Bakterienzelle anzusehen. Man muß sich natürlich dessen bewußt bleiben, daß das Ergebnis dieser Betrachtung auf einem Analogieschluß beruht und vorerst nicht bewiesen ist.

Herrn Prof. Dr. G. Just möchte ich an dieser Stelle für die Förderung, die er meinen Untersuchungen zuteil werden ließ, bestens danken.

Schrifttum.

1a) v. Borries, Ruska, E., u. Ruska, H., Ueber mikroskopische Bakterienaufnahmen. Wissensch. Veröff. Siemenswerke **17** (1938). — 1b) v. Borries, B., u. Ruska, E., Z. techn. Physik **1939**, im Druck. — 2) Caspersson, T., Ueber die Chemie des Zellkerns. Skand. Arch. Physiol. (Berl. u. Lpz.) **73** Suppl. Nr 8 (1936). — 3) Jollos, V., Variabilität und Vererbung bei Protisten. Zbl. Bakter. I Orig. **93** (1924). — 4) Köhler, A., Mikrophotographische Untersuchungen mit ultraviolettem Licht. Z. Mikrosk. **21** (1904). — 5) Piekarski, G., Zytologische Untersuchung an Paratyphus- und Colibakterien. Arch. f. Mikrobiol. **8** (1937). — 6) Ders., Zytologische Untersuchungen an Bakterien im ultravioletten Licht. Zbl. Bakter. I Orig. **142** (1938). — 7) Piekarski, G., u. Ruska, H., Uebermikroskopische Darstellung von Bakteriengeißeln. Klin. Wschr. **1939**, Nr 11. — 8) Dies., Uebermikroskopische Untersuchungen an Bakterien, unter besonderer Berücksichtigung der sogen. Nukleoide. Erscheint demnächst im Arch. f. Mikrobiol. 1939. Pietschmann, K., u. Rippel, A., Arch. f. Mikrobiol. **3**, 422 (1932). — 9) Seiffert, W., Genetische Studien an Bakterien. Reichsgesdh.bl. **1936**, II. 27. — 10) Stille, B., Zytologische Untersuchungen an Bakterien mit Hilfe der Feulgenschen Nuklealreaktion. Arch. f. Mikrobiol. **8** (1937).

Tafelerklärung.

Abb. 1. Bact. proteus. Primärform. Nuklealreaktion (zur leichteren Darstellung nachträglich mit Giemsa gefärbt). Vergr. etwa 1200 : 1. (Original.)

Abb. 2 A. Bact. prodigiosum (Fortner) wachsende Bakterien, lebend photographiert (vgl. Text). Vergr. etwa 1050 : 1. (Original.)

Abb. 2 B. Bact. prodigiosum (Fortner). Parallelstadien zu den Lebend-Photographien (vgl. Abb. 2 A). Nuklealreaktion. Vergr. 1050 : 1. Wegen der unterlassenen Plasma-Gegenfärbung sind die Zellgrenzen nur schlecht zu erkennen. (Original.)

Abb. 3. Bact. prodigiosum (Fortner). a) Zellen aus 3 Monate alter Schrägagarkultur; nur Sekundärstadien (Färbung Karminessigsäure); b) das gleiche Kulturmaterial nach Aussaat auf frischen Nährboden und 2stünd. Wachstum bei 25° C. Neben Sekundärformen auch ganz junge Primärformen, die stark gefärbten Bakterien. Beide Präparate mit K.E.S. gefärbt. Vergr. etwa 1200 : 1. (Original.)

Abb. 4. Paratyphusbakterien nach 7stündigem Wachstum auf 0,7proz. LiCl-Agar. Färbung: Karminessigsäure. Vergr. 1000 : 1 (aus Seiffert).

Abb. 5. Bact. proteus. Uebermikroskopische Aufnahme einer Zelle aus etwa 12 Std. alter Kultur. (Nach Piekarski und H. Ruska, 1939.) Vergr. 6000 : 1.

Abb. 6. Bact. pyocyaneum. Primärform mit 4 Nukleoiden. Zelle kurz vor der Teilung etwa 6000 : 1. (Nach Piekarski u. H. Ruska, unveröffentlicht.)

Abb. 7. Bact. proteus. Sekundärform in Teilung, elektronenoptisch. (Nach Piekarski und H. Ruska, unveröffentlicht.)

Abb. 8. Bact. coli, elektronenoptisch. (Aus v. Borries, E. und H. Ruska 1938.)

---

1) Anmerkung bei der Korrektur: In einer soeben erschienenen Arbeit (Chromosoma **1**, 1939) kommt T. Caspersson auf Grund weiterer Untersuchungen über die Rolle der Desoxyribosenukleinsäure (Thymonukleinsäure) bei der Zellteilung zu folgendem Ergebnis: „Da die Desoxyribosenukleinsäuren so elektiv in den gentragenden Elementen der Zelle lokalisiert sind und vor der Zellteilung in großen Mangen auftreten, zu der Zeit, in welcher vermutlich die Genreduplikation sich vollzieht, ist eine Korrelation zwischen diesen beiden Phänomenen als wahrscheinlich anzunehmen."

Abb. 9. Bact. pyocyaneum aus 24 Std. alter Kultur. Dichte Zellenden, die Orte, an denen die kernahnlichen Strukturen liegen. Primarform. Vergr. 7000 : 1. (Nach Piekarski und H. Ruska, unveroffentlicht.)

Abb. 10. Bact. coli aus 8 Tage alter Kultur. In der Mitte der Zellen dichtere Struktur. Sekundarform. Vergr. 9000 : 1. (Nach Piekarski und H. Ruska, unveroffentlicht.)

20. W. Schwartz (Karlsruhe)[1]) und E. Sauter (Berlin):

Untersuchungen über die Wirkung ultrakurzer Wellen auf die Bakterienzelle.

Ausgangspunkt der Untersuchungen war, festzustellen, ob sich die angebliche bakterientötende Wirkung ultrakurzer Wellen für die Lebensmittelfrischhaltung dienstbar machen läßt. Ultrakurze Wellen finden heute — abgesehen von der Nachrichtenübermittlung und der Navigation — besonders in der Medizin Verwendung.

Die Durchsicht der auf dem Gebiet der Ultrakurzwellentherapie vorliegenden Literatur ließ jedoch erkennen, daß über die grundsätzlich wichtige Frage, ob und unter welchen Bedingungen es möglich ist, Bakterien im Ultrakurzwellenfeld abzutöten, noch keine Klarheit besteht.

An diesem Punkt haben unsere Untersuchungen eingesetzt.

Es ergab sich, daß es tatsächlich gelingt, unter bestimmten Versuchsbedingungen Bakterien bei Behandlung mit ultrakurzen Wellen verschiedener Wellenlänge abzutöten, ohne daß es zu einer nennenswerten Erwärmung des Mediums kommt, in dem sich die Bakterien befinden. Voraussetzung hierfür ist allerdings, daß hohe maximale Feldstärken auf die Bakterien einwirken, wie man sie bei der Erzeugung gedämpfter Schwingungen mit Induktorium und Funkenstrecke erhält. Auch mit den zu therapeutischen Zwecken konstruierten Röhrengeneratoren läßt sich bei entsprechender Aenderung ihrer Arbeitsweise dieser Effekt erzielen.

Es wurden in zahllosen Einzelversuchen die Bedingungen ermittelt, an die der Erfolg gebunden ist. Hieraus ergeben sich einerseits wichtige Anregungen für eine Verbesserung der therapeutischen Anwendbarkeit ultrakurzer Wellen und andererseits Ausgangspunkte für Versuche zur Entkeimung von Lebensmitteln mittels ultrakurzer Wellen. Was sich auf diesem letztgenannten Gebiet erzielen läßt, muß zukünftigen Versuchen vorbehalten bleiben, die bereits in Angriff genommen sind.

Die ausführliche Arbeit erscheint im Archiv für Mikrobiologie.

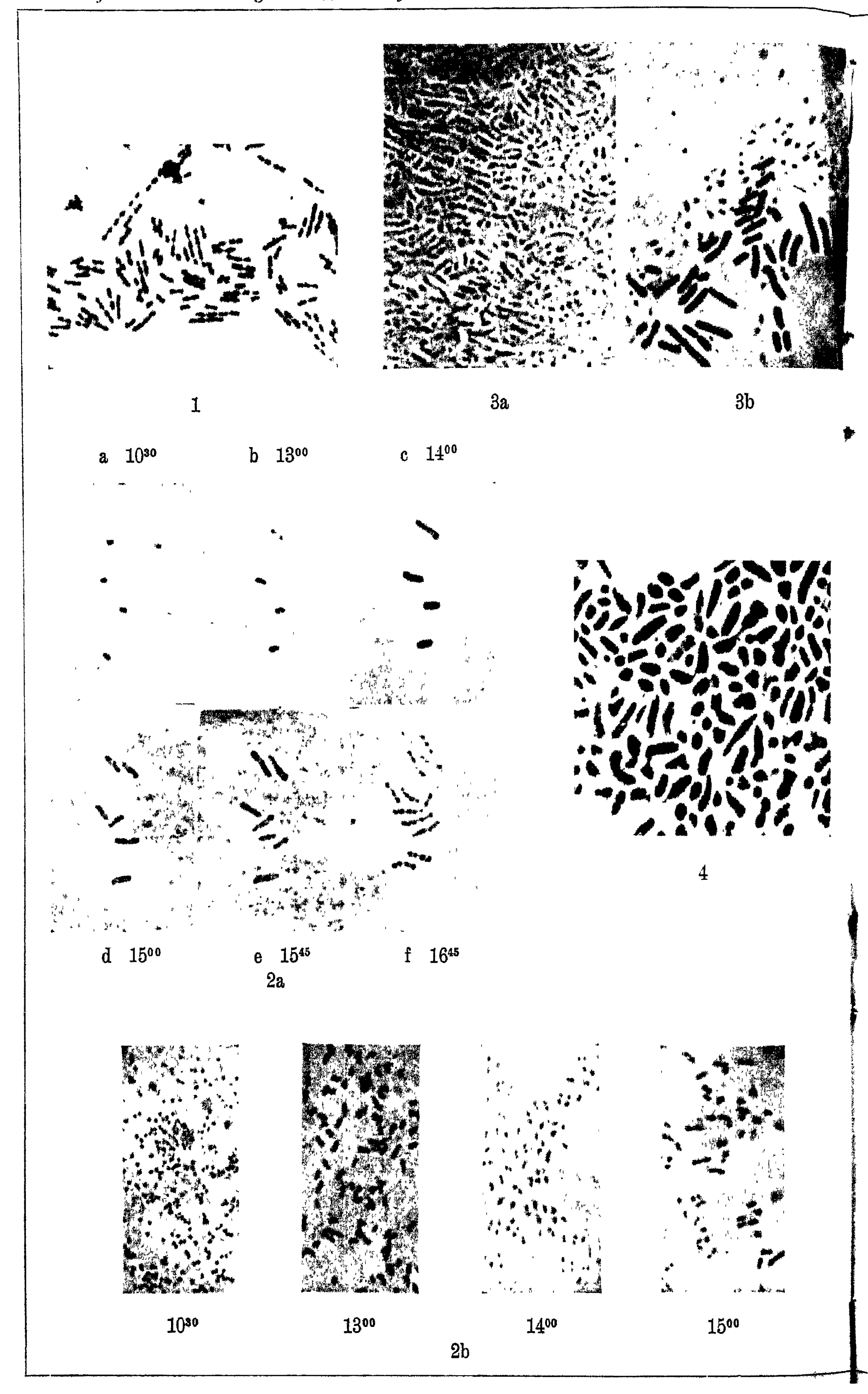
Aussprache.

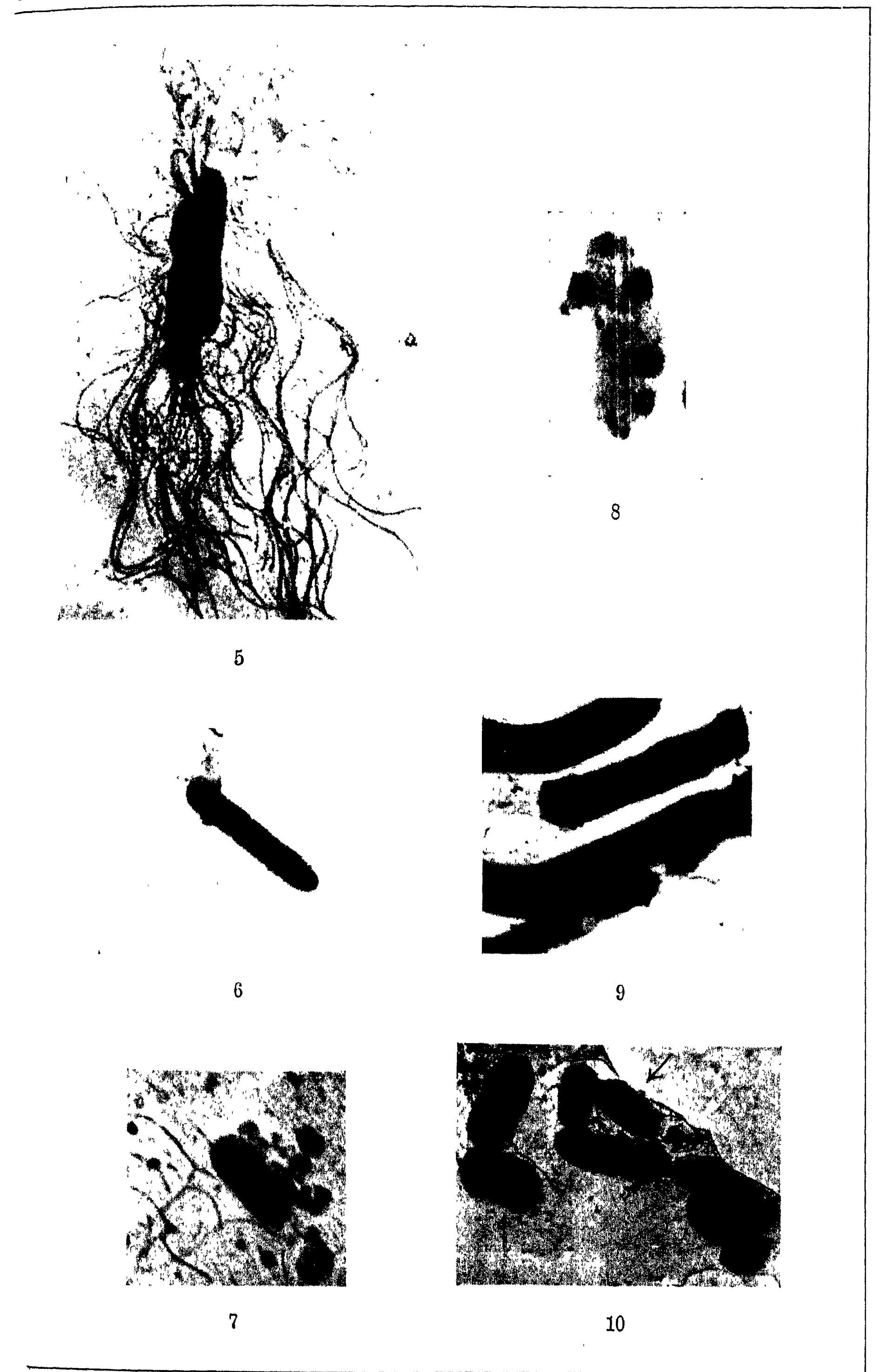
Azzo Azzi und Carlo Re (Torino):

Wir haben mit viel Interesse die Mitteilung des Kollegen Dr. Schwartz über die Wirkung der ultrakurzen Wellen auf die Bakterienzellen gehort.

Auch wir haben in Turin verschiedene Arten pathogener Bakterien der Wirkung kurzer Wellen unterworfen.

1) Aus dem Botanisch-Mikrobiologischen Institut der Technischen Hochschule Karlsruhe.


1
3a
3b
a 10^{30}
b 13^{00}
c 14^{00}
4
d 15^{00}
e 15^{45}
f 16^{45}
2a
10^{30}
13^{00}
14^{00}
15^{00}
2b


5
6
7
8
9
10

Unter den, den Ausstrahlungen ausgesetzten Kulturen möchte ich erwähnen: Escherichia coli, Staphylococcus pyogenes var. aurea, Bact. paratyphi A, Diplococcus pneumoniae, Serratia marcescens.

Diese Bakterien wurden mittels zweier Platinösen 24 Std. alten Brodokulturen entnommen; jede dieser Platinösen wurde in 10 ccm Kochsalzlösung gebracht in zwei verschiedenen Reagenzgläsern, aus denen zwei fortschreitende Serien von Verdünnungen der ausgesetzten Mikroorganismen hergestellt wurden.

Dieselben waren eine halbe Stunde lang der Wirkung von Kurzwellen innerhalb eines von Asbest ausgekleideten Holzkastens unterworfen, der mittels eines elektrischen Thermoregulators unter konstanter Temperatur gehalten wurde.

Die verwendeten Wellenlängen betrugen 7,36 m und 4,30 m. Dieselben Bakterienzellen wurden in aufeinanderfolgenden Zwischenräumen von 4, 6 und 12 Std. der Wirkung der Kurzwellen ausgesetzt. Die Erscheinungen der den Strahlen unterworfenen Kulturen unterschieden sich nur wenig von denen der nicht bestrahlten, sowohl hinsichtlich des Wachstums als auch der anderen Eigenschaften der Mikroorganismen.

Als Beispiel werde ich die Strahlungswirkung auf Staphylococcus pyogenes var. aurea und Escherichia coli in Betracht ziehen:

a) Auf Staphylokokkus angewendet zeigte die Wellenlänge von 4,30 eine wachstumshemmende Wirkung, die auch nach Einwirkung der Strahlen in Abständen von mehreren Stunden zu bemerken waren. Dagegen zeigten Kurzwellen von 7,36 m Wellenlänge eine unbestimmte, nach mehrmaliger Bestrahlung in aufeinanderfolgenden Zeitabschnitten eine wachstumsfördernde Wirkung.

b) Die Wirkung der Kurzwellen von 4,30 m Wellenlänge auf Escherichia coli war sofort wachstumsfördernd, während die Wirkung dieser von 7,36 m Wellenlänge keine wesentlichen Unterschiede von den nichtbestrahlten Bakterienzellen zeigte.

Die kleinen Abweichungen, die gefunden wurden, hätte man ebensogut aus dem Irrtumsprozentsatz erklären können, der in diesem Falle in Betracht gezogen werden muß.

Betreffs des Bact. coli möchte ich hervorheben, daß wir bei den bestrahlten Mikroorganismen in großer Menge Formen vom Typ S.R. fanden und nur selten die Form vom Typ R.

Zusammenfassend war unter unseren Versuchsbedingungen keine besondere Wirkung der Kurzwellen von Wellenlänge 4,30 m und 7,36 m auf die Bakterienzellen zu bemerken.

Dieser Vorgang hätte durch Veränderung der Wellenlänge der für diesen Fall kräftigsten Welle verschiedene Wirkung auf die gleichen Mikroorganismen zeigen sollen, während tatsächlich die Wirkung der Bestrahlung durch das Wiederherstellungsvermögen der Mikroorganismen aufgehoben wurde.

H. Ruska (Berlin):

Feulgen-positive Substanzen sind von russischen Autoren auch bei Tuberkelbazillen beschrieben worden[1]).

Ihre Anordnung entspricht etwa dem Bild das man im Uebermikroskop von diesen Bakterien erhält. Ich zeige die Bilder eines hühnerpathogenen Stammes, die in Zusammenarbeit mit Prof. Lembke und Dr. Christophersen (Kiel) gewonnen worden sind, jedoch noch aus einem anderen Grunde, und zwar deshalb, weil es gelungen ist, den Ort nachzuweisen, an dem die ätherlöslichen Substanzen des Tuberkelbazillus sitzen. Vergleicht man unbehandelte oder hydrolysierte Bakterien mit Aether-extrahierten, so zeigt sich, daß die Aetherextraktion die ursprünglich homogenen, großen, kugeligen Zelleinschlüsse in ein schwammartiges Gerüst verwandelt hat. Die ätherlöslichen Substanzen müssen demnach in feinster tröpfchenförmiger Verteilung (Tröpfchendurchmesser 10—50 mμ) in einem Gerüst der beschriebenen Kugeln sitzen. (Eine ausführliche Arbeit mit übermikroskopischen Aufnahmen wird demnächst erscheinen.)

A. Rippel (Göttingen):

Pietschmann u. Rippel fanden bei B. mycoides nach Feulgen diffuse Kernreaktion, bei Lithiumbehandlung eine Entmischung. Die gleich große bacillaris-Hefe zeigte bei gleicher Behandlung einen Kern. Stille fand dagegen nur gleichmäßige Bilder mit distinkt gefärbten Körnchen bei Abänderung der Hydrolysetemperatur auf 40°. — Die Absorption der ultravioletten Strahlen bei der ultravioletten Photographie ist nicht spezifisch und wird auch durch Chlorophyll, Huminstoffe, Katalase (Porphyrinkomplex), Ergosterin bewirkt. Rhizopus z. B. ergab Absorption der ultravioletten Strahlen durch den ganzen Zellinhalt. Auch die Ergebnisse an Bakterien sind also noch mit Vorsicht zu verwerten.

1) Epstein, Ravish-Birger und Svinkina. Ref. in Ber. wiss. Biol., Bd. 37, S. 95.

J. Bürgers (Königsberg):

Das Auftreten von 2 Polkörperchen vor der Teilung habe ich schon vor 15 Jahren beobachtet. Das war der Grund, weswegen ich mich in den letzten Jahren für die Körnchenfrage interessierte, über welche Dr. Lodenkämper berichtet hat. Ich spreche die Bitte aus, daß parallel zu den übermikroskopischen Aufnahmen die Entstehung vegetativer Originalformen aus Körnchen einer Nachprüfung unterzogen wird, wobei die Kulturen allerdings sehr lange beobachtet werden müssen.

Bachmann (Kiel)

erinnert an die aus dem Königsberger Institut hervorgegangene Arbeit von Bahrmann über Entwicklungszyklen von Bakterien, bei denen die gleichen Innenstrukturen der Bakterienzelle nachgewiesen und im Bilde festgehalten worden sind (Arch. f. Hyg.), wie sie der Vortragende gezeigt hat. Weiterhin wird auf eigene fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen an Diphtheriebakterien und diphtheroiden Stäbchen mit Nachweis ähnlicher Innenstrukturen hingewiesen, ohne daß die Berechtigung besteht, sie als Zellkerne zu deuten.

Piekarski (Berlin-Dahlem) Schlußwort:

Die Möglichkeit einer Beziehung zwischen den von Bürgers u. Lodenkämper gefundenen filtrierbaren Formen halte ich für durchaus gegeben, ja sogar wahrscheinlich, doch kann man sie kaum mit ihnen gleichsetzen. — Die von Herrn Rippel gefundene unspezifische Ultraviolettabsorption ist sehr überraschend. Ich selbst habe diese Erfahrung bei Verwendung von ultraviolettem Licht von 0,260—0,275 μ Wellenlänge bisher nicht gemacht, sondern z. B. bei Untersuchung von Trypanosomen die von Köhler, Caspersson u. a. gefundene spezifische Absorption durch die Kernsubstanz bestätigen können. Die Schwierigkeiten, die bei den Untersuchungen der Bakterien im U.V.-Licht auftreten, haben allem Anschein nach besondere Ursachen (vgl. meine Ausführungen auf S. 143*). — Den positiven Ausfall der Nuklealreaktion bei den Bakterien halte ich für durchaus spezifisch, zumal die Hydrolyse stets bei 58—60° vorgenommen wurde.

21. Heinrich Delitsch (Kiel):

Ueber technisch wichtige Schimmelpilze [1]).

„Schimmelpilze", das ist kein Begriff der botanischen Systematik, sondern ein Begriff der Praxis. Im Gegensatz zu den Bakterien und Hefen sind es Landpflanzen. Sie verlangen daher weniger Wasser, unter 20 Proz. — Bakterien verlangen meist 30 Proz. oder mehr. Außerdem gedeihen die meisten Schimmelpilze besser auf schwach sauren Nährböden und kommen mit einer einfachen organischen Verbindung, wie Milchsäure oder Glyzerin, aus.

Die Unterordnung der Mukorineen gehört geschlossen hierher. Das Myzel ist unseptiert, d. h. ohne Querwände. Bei einigen Arten, z. B. Mucor mucedo, zerfließt die Sporangienwand bei Benetzung; die Sporen sind in Schleim eingebettet und werden vor allem durch fließendes Wasser und spritzendes Regenwasser verbreitet, ferner durch Insekten und andere Tiere. Wenn sie an Gras und Kräutern festkleben, werden sie von Tieren gefressen, sie überstehen die Darmpassage und keimen im Mist. Bei anderen Arten, z. B. Rhizopus nigricans, zerbröckelt das Sporangium, die Sporen sind trocken und werden vorwiegend durch den Luftzug verbreitet. Diese zwei

1) Aus dem Bakteriologischen Institut der Preußischen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft in Kiel (Direktor: Professor Dr. habil. A. Lembke).

ökologischen Typen von Sporen: 1) schleimige Sporen, 2) trockene Luftsporen, finden wir bei den verschiedensten Schimmelpilzen. Ihre Kenntnis ist wichtig für die Bekämpfung schädlicher Pilze. — Wichtigste Gattungen: Mucor, Rhizopus, Absidia. Technische Verwendung: Verzuckerung von Maisstärke; vielleicht läßt sich auch die Fumarsäuregärung verwerten. Manche thermophile Arten können u. U. pathogen werden, z. B. mykotischen Abortus bei Rindern hervorrufen, besonders aus Dänemark bekannt. Vielleicht sind die dortigen Rinderrassen infolge von stärkerer Ueberzüchtung empfindlicher. — Bei anderen Gattungen finden wir interessante Uebergänge von der Sporangienvermehrung zur Konidienvermehrung.

Weitaus die meisten Schimmelpilze gehören zu den Fungi imperfecti, das sind Pilze ohne jedes Rudiment einer geschlechtlichen Vermehrung, und deren natürliche Verwandtschaft unbekannt ist. Unter diesen gehören sie zu den Hyphomyzeten oder Konidienträgerpilzen. Sie vermehren sich nur durch Konidien, d. h. durch äußerlich abgeschnürte vegetative Sporen oder sporenähnliche Zellen. Diejenigen Askomyzeten, die neben der seltener vorkommenden Vermehrung durch Schlauchsporen in Schläuchen und Perithezien vorwiegend Konidien bilden, ordnet man aus praktischen Gründen auch mit in das künstliche System der Fungi imperfecti ein.

Aspergillus glaucus, der Schimmel, der am wenigsten Wasser braucht. Der extremste Fundort, den ich gesehen habe, war wohl schwarzer Kandiszucker, der sich nicht einmal feucht anfühlte. Er wuchs darauf kräftig und bildete reichlich Konidien. Vielleicht nimmt er Feuchtigkeit aus der Luft auf. Konidien blaugrün, Perithezien goldgelb. Je nach der Rasse und den Außenbedingungen überwiegen bald die einen, bald die anderen. Das Myzel ist farblos oder verschieden gefärbt. Manche Rassen färben auch den Nährboden. — Die Konidien der meisten Aspergillus- und Penicillium-Arten sind schwer benetzbar, bleiben daher auch in feuchter Luft trocken und werden durch den leisesten Luftzug verbreitet. Daher sind diese Pilze fast allgegenwärtig.

Aspergillus niger, größer, mit schwarzen Konidien, ohne Perithezien, kommt auf sauren, zuckerhaltigen Früchten vor, namentlich in wärmeren Ländern, — auch im menschlichen Ohr. Ein sehr anpassungsfähiger Pilz, besonders wichtig durch seine Zitronensäuregärung in saurer Lösung. Bei Kreidezusatz entsteht dagegen vorwiegend Oxalsäure. — Mannitgärung durch weiße Aspergillus-Arten.

Aspergillus fumigatus, der häufigste pathogene Aspergillus. Da er thermophil ist, entwickelt er sich oft im Heu. Bei Menschen, die öfters im Heu schlafen, kann er gefährliche Lungenmykosen hervorrufen. Häufiger ist er in der Lunge von Vögeln, im menschlichen Ohr, auch beim mykotischen Abortus von Rindern.

Die meisten Penicillium-Arten, mit pinselförmigen Konidienträgern, haben ihr Temperaturoptimum bei etwa 20° C. — Penicillium candidum, der weiße, und Penicillium camemberti, der blaue Camembertschimmel, der letztere auch auf Blauschimmelkäse, verbessern das Käsearoma und tragen zur Reifung bei. Reichlich wolliges Luftmyzel, lange Konidienträger, Konidienbildung nur an der Oberfläche. Kulturschimmel, kommen wild kaum vor.

Penicillium roqueforti, auch in Gorgonzola und Stilton, sporuliert auch im Inneren kleiner Hohlräume, sofern diese nur mit der Außenluft in Verbindung stehen. Rasen kurz, sammetartig; Konidien blaugrün. Gedeiht kräftig auf den verschiedensten Substraten. Für die Käserei wird er vorteilhaft auf Reismehl in Pulverform kultiviert. Butter wird ranzig.

Die meisten wilden Penizillien, in der Käserei wegen des unangenehmen, muffigen Geruches als Stinkschimmel bezeichnet, sind auch Butterschädlinge. In Margarine erzeugen sie eine besondere Art der Ranzigkeit, die Parfümranzigkeit, durch Bildung von Methyl-Alkyl-Ketonen aus den abgespaltenen Fettsäuren.

Penicillium purpurogenum, Pinsel mehr symmetrisch, Konidien graugrün, Myzel gelb. Nährboden rot. — Glukonsäuregärung.

Penicillium expansum, Konidien graugrün, Konidienträger oft zu Bündeln oder Koremien vereinigt. Konidienpolster auf faulen Aepfeln und anderen Früchten. Erzeugt in Kultur einen Fruchtgeruch, der dem Geruch einer n/20 wässerigen Lösung von n-Valeriansäure gleicht.

Auch bei Botrytis cinerea macht sich neben dem Modergeruch oft ein solcher Fruchtgeruch bemerkbar. Die Verbesserung des Weinaromas bei Trauben mit Botrytis ist vielleicht auf die Bildung flüchtiger Säuren, bzw. deren Ester zurückzuführen. Dieser Pilz verursacht ferner die Fäulnis von Erdbeeren, von Gewächshauspflanzen usw.

Thielaviopsis paradoxa, ein weiterer Pilz mit Fruchtgeruch, sehr kräftig wachsend. Schädling des Zuckerrohrs und der Ananas und Banane, müßte einmal von einem Gärungschemiker näher untersucht werden. Die Konidien werden im Inneren von Konidienbüchsen gebildet. Aus jungen Konidienbüchsen schieben sich ungeheuer lange Ketten von Konidien hervor. Später entstehen nur noch einzelne Konidien in den Büchsen, und daneben Chlamydosporen in Ketten.

Oospora lactis, vielleicht der häufigste Pilz. Zerfall von Lufthyphen, aber auch von Substrathyphen in Oidien. Der wichtigste Schimmelpilz für die Weichkäserei, da er zusammen mit den Kahmhefen die Milchsäure verzehrt und so die Käsereifung erst ermöglicht. In Butter fast immer vorhanden und je nach der Rasse und der Stärke der Infektion mehr oder weniger schädlich.

Oospora moniliaformis, auch Proteomyces genannt, bildet dichte, strahlig oder hirnartig gefaltete Kolonien. Für den Zweck der Fettgewinnung durch Pilze dürfte sie der vorher genannten Art überlegen sein. Sie ist einer der verhältnismäßig wenigen Pilze, die den Milchzucker spalten können. In der Käserei ist sie schädlich, da sie durch ihre starke Eiweißzersetzung den Käse zum Ablaufen bringt.

Fusarium, mit mehrzelligen, sichelförmigen Makrokonidien und mit einzelligen Mikrokonidien. Zahlreiche Arten, meist Pflanzenparasiten, dieselben Arten auch auf Milchprodukten, besonders Butterschädlinge. Einige Arten mit Fruchtgeruch, andere mit starker Fettbildung. Morphologisch-systematisch ist die Gattung gut, stoffwechselphysiologisch noch fast gar nicht untersucht.

Bei Sporotrichum, einer ungeheuer verbreiteten Pilzgattung, auch einem Butterschädling, sind, wie bei den meisten Schimmelpilzen, auch unsere morphologisch-systematischen Kenntnisse noch äußerst mangelhaft. Lediglich die pathogenen Arten sind etwas besser bekannt, sie erzeugen tiefe Hautläsionen. Die Konidien werden meist unmittelbar seitlich am Myzel abgeschnürt.

Auch von Hormodendron-Cladosporium hat man nur ungenügende morphologisch-systematische Kenntnisse. Pflanzenparasiten und Saprophyten, Stockflecke auf Papier und Leinwand, hervorgerufen durch das schwärzliche Myzel, gefürchtete Ranzigkeitspilze in Butter. Die Konidienbildung auf einfachen Konidienträgern ähnelt im übrigen der Hefesprossung. Die Konidien sind trocken und bei den typischen Arten schwarzgrün.

Uebergangsformen zwischen Schimmelpilzen und Hefen, früher Monilia, jetzt Candida genannt, sind häufige Ranzigkeitspilze in Butter. Manche sind pathogen, z. B. der bekannte Soorpilz, Candida albicans. Dieser ist auch in der Lunge und als Erreger von Hautkrankheiten nicht selten.

Monilia sitophila, der rote Brotschimmel, ist namentlich in französischen Heeresbäckereien verheerend aufgetreten. Auch im Laboratorium ist sie sehr gefürchtet, da das Luftmyzel aus den Kulturgefäßen herauswächst und reichlich trockene Konidien abschnürt. B. O. Dodge stellte fest, daß sie die Nebenfruchtform eines Askomyzeten ist. Ihm glückten interessante Kreuzungen verschiedener Rassen.

Scopulariopsis, früher Penicillium brevicaule genannt, bevorzugt alkalische Nährböden, z. B. alten Weichkäse. Sie bildet Diäthylarsin (Knoblauchgeruch) auf arsenhaltigen Nährböden und dient daher zum biologischen Nachweis von Arsenspuren. Manche Arten sind pathogen, z. B. in Nagelinfektionen und gummaähnlichen Geschwüren.

Ein ganz anderer Typ ist Phoma. Die Konidien werden im Inneren eines vielzelligen Gehäuses, einer Pyknide, abgeschnürt und in Schleim eingebettet. Bei Benetzung quillt eine unwahrscheinlich lange Ranke von Schleim und Sporen aus der Oeffnung hervor. Sie erzeugen schwärzliche Flecken auf Butter und Margarine, da auch das Myzel dunkel gefärbt ist. Diese Arten gehören zum Typ von Phoma betae, die auf Rüben und Rübenblättern vorkommt.

22. W. Reyer (Karlsruhe):

Untersuchungen über Blastozystis [1]).

Blastozystis ist ein bei Mensch und Tier als Darmparasit weit verbreiteter, noch wenig genau bekannter pflanzlicher Organismus. Außer seiner spezifischen Struktur — kugelförmig, mit großer, von einem nur schmalen Plasmasaum umgebener Vakuole im Innern — ist nur sehr wenig sicher Fundiertes bekannt. Als Sitz der Blastozysten im Darm wurde beim Menschen unter normalen Darmverhältnissen Zökum einschließlich Appendix, Kolon und Rektum festgestellt. Weiterhin zeigten Infektionsversuche an Ratten, Mäusen und Hunden mit Blastozysten aus Mensch und Ratte, daß die Blastozysten wirtsspezifisch sind. Die noch sehr umstrittene Art der Vermehrung wurde in Kulturen studiert und durch photographische Serien folgende Vermehrungsarten der menschlichen Blastozystis bewiesen:

a) Zweiteilung durch Durchschnürung.
b) Einfache Knospung.
c) Multiple Knospung.
d) Zerfall verzweigter Stadien in verschieden große Bruchstücke.

Auf Grund der Vermehrungsarten werden 3 Vermehrungstypen bei den menschlichen Blastozysten unterschieden. Von Bedeutung ist der Nachweis der multiplen Knospung bei den menschlichen Blastozysten auch deshalb, weil diese bereits von Schaudinn 1903 beobachtet worden ist, aber irrtümlich der Ruhramöbe, der Entamoeba histolytica, zugeschrieben wurde.

1) Der Vortrag erscheint in ausführlicher Form im Archiv f. Protistenkunde.

Aussprache.

A. Rippel (Göttingen):

Die bei mir angefertigte Arbeit von Behr zeigt für Aspergillus eine saure und eine neutrale Autolyse. Wenn am sauren Myzel keine Protease gewonnen werden kann, so können sekundäre Ursachen entscheidend sein. Auch in stark saurer Lösung vollzieht sich im lebenden Pilz eine verhältnismäßig kräftige Autolyse (teilweiser Abbau von Eiweiß). Die tiefergreifende Wirkung der neutralen Autolyse zeigt das fast völlige Verschwinden auch des Chitins, das in saurer Lösung bis zu 22 Proz. der Trockensubstanz angereichert wird.

A. von Szilvinyi (Wien):

Das Optimum der tropischen Formen von Penicillium (Sumatra) liegt zwischen 35° nnd 37°.

Sammelbericht IV. Demeter (München-Weihenstephan)[1]):

Neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Milchbakteriologie[2]).

Mit 1 Abbildung im Text.

Ich glaube, es ist am zweckmäßigsten, wenn wir die einzelnen Fragen in der Reihenfolge besprechen, wie der Weg verläuft, den die Milch vom Euter der Kuh bis zu ihrer Verbrauchsstätte zurücklegt, möge sie nun frisch, pasteurisiert, gesäuert, kondensiert, getrocknet oder in Form von Butter und Käse auf den Tisch des Verbrauchers kommen. Es ist selbstverständlich, daß mir bei der Fülle des zur Diskussion stehenden Materials die beschränkte Redezeit nicht erlaubt, einen lückenlosen und zusammenhängenden Bericht zu erstatten, sondern daß ich mich damit bescheiden muß, die wichtigeren Punkte herauszuheben, ohne wiederum zu sehr ins einzelne zu gehen. Auch möchte ich absichtlich die pathogene Seite nur gelegentlich streifen, da sie der Mehrzahl von Ihnen als Aerzten und Tierärzten an und für sich geläufig sein dürfte.

Beginnen wir mit der Milch im Euter. Daß aseptisch gewonnene Milch Bakterien enthält. ist eine schon lange bekannte Tatsache. Dabei schwanken bezüglich des Keimgehaltes nicht bloß die einzelnen Zitzen, sondern es weist auch ein und dasselbe Viertel nicht immer denselben Keimgehalt auf (Wolf 1932). Was die Keimzahlen betrifft, so haben neue Untersuchungen von Steven und Jones (1938) gezeigt, daß der 1928 von A. F. Breed angegebene Durchschnitt von mehr als 500 pro ccm zu hoch gegriffen sein dürfte. Sie erhielten Schwankungen von 49—511 pro ccm. Unvollständiges Ausmelken verursacht eine Erhöhung des Keimgehalts des nächstfolgenden Gemelkes. Eigenartigerweise wurde diese Beobachtung nicht gemacht, wenn im Anschluß an das Maschinenmelken das Nachmelken unterlassen wurde (Wallis et al., 1932; Petersen u. Swenson, 1932). Hinsichtlich der Arten stellen, wie seit langem bekannt, die Mikrokokken (Staphylokokken) das Hauptkontingent. In neuerer Zeit sind, nebenbei

1) Süddeutsche Forschungsanstalt für Milchwirtschaft.

2) Die Literatur findet sich in dem voraussichtlich Ende des Jahres herauskommenden neubearbeiteten Teil I „Mikroorganismen in der Milch" des Lohnisschen Handbuchs der Landwirtschaftlichen Bakteriologie (Verlag Bornträger, Berlin).

bemerkt. Fälle bekannt geworden, daß Malzgeschmack verursachende Euterkokken epidemieartige Ausbrüche von Gastroenteritis verursachten (Crabtree und Litterer, 1934; Jordan und Burrows, 1934; Saughnessy und Grubb, 1936, u. a.). Im Vergleich zu den Mikrokokken treten die Milchsäurestreptokokken völlig zurück, die Mastitisstreptokokken sind dagegen auch beim gesunden Euter als regelmäßige Bewohner anzusehen (Hucker, 1937). Zu den allerhäufigsten Bewohnern des Kuheuters zählt auch nach Dorner (1930), Steck (1932) und Bendixen (1933) das Corynebacterium lipolyticum. Daß auch saprophytäre „Virus"-Stämme in Milch vorkommen sollen (Oerskov, 1932, 1938; Sherman, 1931), möge der Vollständigkeit halber erwähnt werden.

Was den Weg betrifft, auf dem Invasion des Euters mit Bakterien vor sich geht, so dürfte, abgesehen von besonderen Fällen bei pathogenen Bakterien, der Weg von außen her durch die Zitze als der normale zu bezeichnen sein. Dies gilt auch für die Mastitisstreptokokken: Begünstigung der Ansiedlung durch Altmelksein (Klimmer und Haupt, 1932), Naßmelken (Seelemann und Siemonsen, 1932) und Druck (Klimmer und Haupt, 1933). Um aber eine Entzündung eintreten zu lassen, bedarf es sog. Hilfsursachen nach Seelemann (1932).

Was die Infektion der Milch beim Melkakt betrifft, so hat sich gezeigt, daß der Keimgehalt durch Anwendung von sog. Melkerfett auf etwa $^1/_6$ verringert werden kann (Freund, 1933). Mit Nachdruck ist während der letzten Jahre auch die Notwendigkeit eines wirksamen Desinfektionsmittelzusatzes betont worden (Breidert, 1934; Seelemann, 1935; Roemmele, 1935 u. a.). Einige Autoren fanden wegen der besseren Tiefenwirkung das fett- bzw. vaselinefreie, wasserlösliche Weidneritgel zweckmäßiger (Schmidt-Hoensdorf, 1935/36 u. a.).

Die zur Abhaltung der Keime in allen möglichen Formen (zum Teil mit komplizierten Filtrationseinrichtungen) versehenen Reformmelkeimer haben sich wegen der schweren Sterilisierbarkeit und der großen Gefahr der Kontaktinfektion als unzweckmäßig erwiesen. Am besten ist immer noch der einfache abgedeckte Melkeimer mit einer handgroßen Oeffnung zum Hineinmelken.

Das besondere Interesse beansprucht die Melkmaschine. Es dürfte kein Zweifel mehr darüber bestehen, daß die gut konstruierte Melkmaschine bei zweckentsprechender Behandlung aller Teile eine Milch zu gewinnen erlaubt, die zwar nicht der sorgfältigst mit der Hand ermolkenen gleichkommt, aber immerhin einen befriedigend niedrigen Keimgehalt aufweisen kann. Die Schwierigkeit liegt lediglich in der Behandlung der Maschinen durch nicht genügend geschultes Personal in den praktischen Betrieben. Es sind Bedenken aufgetaucht wegen Verminderung der Käsereitauglichkeit (Doll, 1928) der Maschinenmilch und der Begünstigung der Streptokokkenmastitis. Zum ersten Punkt ist zu bemerken, daß die angebliche Käsereiuntauglichkeit auf Faktoren beruhen kann, die gar nichts mit der Maschine zu tun haben (z. B. Renner, 1930). Bezüglich des zweiten Punktes ist es selbstverständlich, daß ein für Mastitis disponiertes oder gar schon erkranktes Euter für Maschinenmelken nicht in Betracht kommt (Kerman, 1931; Lane, 1935). Im übrigen hat sich aber in eingehenden Untersuchungen von Stenström (1925), Klimmer und Haupt (1929), Seelemann (1930), Schmidt-Hoensdorf und Schmidt (1932) gezeigt, daß mit der Maschine trotz ausgiebigster Gelegenheit zur Infektion keine Mastitis zu erzeugen ist und daß das Maschinenmelken hinsichtlich des Einflusses auf den Gesundheitszustand des Euters einem sehr guten Handmelken gleichzuachten ist.

Von weiteren beim Melken wichtigen Faktoren seien noch folgende erwähnt. Nach Untersuchungen in Weihenstephan (Förg, 1935) ergab sich in Bestätigung früherer Ergebnisse, daß eine direkte Beziehung zwischen dem Keimgehalt der Milch und dem verabreichten Futter kaum besteht, wenn man sorgfältig eine Kotverschmutzung vermeidet. Ist dies aber nicht der Fall, ergibt sich in großen Zügen eine ziemliche Uebereinstimmung der beiden Kurven „Keimgehalt des Kotes und Keimgehalt der Milch“ mit einem Maximum während der ersten Hälfte der Grünfütterungsperiode und einem Minimum ungefähr im Spätherbst nach Einsetzen der Trockenfütterung. Ueber die Beeinflussung der Milch durch Silagefutter wird beim Kapitel „Käsereitauglichkeit“ zu sprechen sein. Was die jahreszeitlichen Beziehungen zwischen Keimgehalt der Stallluft und demjenigen der Milch betrifft, so konnte zunächst eine negative Korrelation zwischen Luftkeimgehalt und Minimumtemperatur festgestellt werden. Diese Gegenläufigkeit der beiden Kurven erklärt sich ohne weiteres aus der Tatsache, daß mit zunehmender Kälte die Lüftung des Stalles vermindert und infolgedessen die Luft desselben mit Keimen angereichert wird. Was die Beziehungen der Luftinfektion zum Milchkeimgehalt betrifft, so zeigte sich eine gewisse Gleichsinnigkeit der beiden Kurven im Herbst und Winter, während sich die Kurve des Milchkeimgehaltes von derjenigen des Luftkeimgehaltes während der wärmeren Jahreszeit derart emanzipierte, daß sie sogar in der ersten Hälfte der Grünfutterperiode einen ausgesprochen gegensinnigen Verlauf nahm. Hier spielen eben andere Faktoren eine wichtigere Rolle (z. B. Einfluß der Kotverschmutzung).

Ganz kurz noch zur Frage, inwieweit ganz allgemein eine Korrelation besteht zwischen bakteriologischer Qualität der Milch und der Summe der Einflüsse, die sich bei der Milchgewinnung bemerkbar machen. Eingehende Untersuchungen darüber an Hand eines Stallpunktierungssystems in Weihenstephan (Demeter und Sauer, 1933) zeigten, daß eine Beziehung zwischen Punktzahl für „Stalleinrichtung“ und der Milchkeimzahl nur in sehr weiten Grenzen bestand, während die Uebereinstimmung wesentlich besser war, wenn die Punktzahl für die „Methoden“ bei Gewinnung und Behandlung mit dem Keimgehalt der Milch in Beziehung gesetzt wurde. Somit hat die Stalleinrichtung für die Gewinnung keimarmer Milch keine so große Bedeutung wie die bei der Gewinnung angewendeten Methoden, eine Tatsache, die allerdings die Bauern nicht dazu veranlassen soll, nun auf eine Verbesserung der Stalleinrichtung zu verzichten.

Wir verlassen nun die Milchgewinnung und gehen zur Milchbehandlung und -bearbeitung in der Molkerei über.

Eine mechanische Entfernung der in der Milch vorhandenen Mikroorganismen durch Filtrieren oder Zentrifugieren ist nur in sehr beschränktem Umfang möglich. Im Durchschnitt beobachtete Masek (1935) bei der Filtration eine Keimverminderung um $^1/_7$. Die Milchsäurestreptokokken schienen mit Vorliebe im Filter hängen zu bleiben. Plock, Seelemann und Mitarbeiter (1936) stellten fest, daß auch Tuberkelbazillen in großer Menge vom Filter zurückgehalten werden können. Bei der Filtration ist es wichtig, daß die Apparate nicht durch fehlerhafte Konstruktion ein gewaltsames Hindurchpressen von Schmutz und eine weitgehende Zerteilung der Bakterienaggregate verursachen. Dadurch wird die Haltbarkeit der filtrierten Milch oft ungünstig beeinflußt, niemals verbessert. Wichtig ist es, die Milch nach Gewinnung möglichst bald zu filtrieren (Dahlberg, 1930, Mezger und Umbrecht, 1932), weil im noch warmen Zustand keine Porenverstopfung durch Fettanhäufung eintritt und

weil zu dieser Zeit noch sehr wenig Schmutz in der Milch aufgelöst ist. Nach Plücker (1935) beträgt der bakterienhaltige, lösliche Teil des Kuhkotes rund 90 Proz.

Es ist selbstverständlich, daß bei der ausschließlich in den Molkereien üblichen Reinigung der Milch durch die Zentrifuge infolge der stärkeren mechanischen Beeinflussung auch die Keimzerteilung eine stärkere als bei der Filtration ist (Dorner und Stähli, 1936; Düggeli, 1937 u. a.). Der Temperaturfaktor spielt hier eine große Rolle. Um die Körpertemperatur herum wird nämlich nicht bloß die Aufrahmung am meisten geschädigt (Dahlberg und Marquardt, 1924), sondern es werden auch die Keimgruppen am stärksten zerkleinert und verteilt, wodurch eine stärkere (wenn auch nur scheinbare) Keimzunahme verursacht wird (Schmidl, 1927; Hüttig und Mitarbeiter, 1933). Was die Ausschleuderung der Keime in den Zentrifugenschlamm betrifft, so scheint nicht bloß das spezifische Gewicht maßgebend zu sein (das übrigens bei ein und derselben Art sehr wechseln kann), sondern neben anderen Faktoren auch das Stokessche Gesetz, wonach in einer Flüssigkeit unter sonst gleichen Bedingungen die Sedimentierungsgeschwindigkeit von Teilchen gleicher Dichte mit dem Quadrat des Radius zunimmt. Dies läßt sich aus Versuchen schließen, bei denen ein um so gründlicheres Ausschleudern von Mikroorganismen beobachtet wurde, je größer diese waren (Marshall und Hood, 1918; Kalkschmidt, 1937). Daß jedoch die Herausnahme von Bakterien aus der Milch durch die Zentrifugenwirkung praktisch keine wesentliche Keimverminderung bedeutet, geht daraus hervor, daß der Zentrifugenschlamm: 1. nur einen sehr geringen Bestandteil der ursprünglichen Milch ausmacht (wechselnd von etwa 0,08—0,6 Proz.), 2. selbst auch nur zu 20 Proz. aus Bakterien besteht (Keller, 1937). Keller betont jedenfalls ganz richtig, daß beim scharfen Zentrifugieren ohne Zweifel auch ernährungswichtige Stoffe aus der Milch herausgeschleudert werden, deren Beseitigung die Milch anfälliger für Milchfehler macht! Jedenfalls ist durch das Zentrifugieren die Haltbarkeit einer Milch noch nie verbessert worden. Zum Schluß dieses Kapitels sei darauf hingewiesen, daß die Nachteile, die bei der physikalischen Milchreinigung zutage getreten sind, sich ins Gegenteil verkehren, wenn die Milch nach gesetzlicher Vorschrift einem Reinigungsverfahren unterworfen wird, um anschließend die in ihr enthaltenen Keime besser durch die Pasteurisierung abtöten zu können. Die leichtere Abtötung kommt durch die bessere Verteilung der Bakterien und die gründliche Entfernung des die Keime vor der Hitzeeinwirkung schützenden Schmutzes zustande. Allerdings konnten neuerdings Plock, Seelemann und Mitarbeiter (1936) gerade im Hinblick auf Tbc.- und Bangbakterien einen Unterschied in der Hitzeabtötung im Zusammenhang mit vorausgehender Reinigung nicht finden, weshalb nach ihrer Ansicht die Milchreinigung mehr aus allgemein hygienischen Gründen vorzunehmen ist.

Bevor wir aber die Milcherhitzung besprechen, mögen noch einige Betrachtungen der Milchkühlung bzw. der Hemmung und Abtötung von Mikroorganismen durch Kältewirkung gewidmet sein. Eine Hemmung der meisten Milchkeime ist verhältnismäßig leicht möglich, die kritische Temperatur für gutes Wachstum liegt etwa bei 10—12° C. Nun gibt es aber eine sog. kryophile Flora, die noch bei Kühlraumtemperaturen von 4—8° C ein ausgezeichnetes Wachstum aufweist. Hier sind besonders die Fluoreszenten zu nennen. Interessant ist jedoch, daß eine große Anzahl von Keimen nicht bloß in der Nähe des Gefrierpunktes verhältnismäßig gut gedeiht, sondern sogar noch bis zu —7° C (verschiedene Fungi imperfecti, Milchsäurelang-

stäbchen- und Fluorescens-Stämme (nach Horowitz-Wlassowa, 1933; Berry, 1933; Hess, 1934). Nach weiteren Beobachtungen in Eiscreme (Weinzirl und Gerdeman, 1929) darf man die untere Grenze des Wachstums etwa bei —10° C annehmen. Eine restlose Abtötung durch Kälte ist viel schwerer zu erreichen als eine Hemmung, zum Teil überhaupt nicht. Es hat sich bei Milchsäurebakterien und der Coligruppe eine sehr große Kälteresistenz herausgestellt (monate- bis jahrelange Konservierung bei —10 bis —15° C, nach Staiger und Glaubitz, 1929; Berry, 1933, Rahn und Bigwood, 1938), eine noch größere bei pathogenen Vertretern der Coligruppe (Typhus, Paratyphus) sowie Tbc.- und Abortuskeimen (7 Jahre und länger bei etwa —23° C; nach Prucha und Brannon, 1916; Wallace 1933, 1938).

Ueber die Keimvernichtung durch Erhitzen (Pasteurisieren) möchte ich trotz seiner großen Bedeutung nur ganz zusammenfassend sprechen, um dem Spezialvortrag[1]) von Herrn Kollegen Lembke nicht vorzugreifen. Wir haben in Deutschland heute drei verschiedene Arten von amtlich zugelassenen Pasteurisierungsverfahren: 1. die Hocherhitzung während einer Minute auf 85° C und eine Abwandlung desselben, die sog. Momenterhitzung der Milch auf 85° C in dünner Schicht ohne Heißhaltung, 2. die Dauerpasteurisierung (auch Niedrigpasteurisierung genannt) während 30 Min. auf 62—65° C, und 3. die Kurzzeiterhitzung der Milch in dünner Schicht auf Temperaturen zwischen 71—74° unter anschließender Heißhaltung während ungefähr 40 Sekunden. Die Kurzzeiterhitzung ist also ein Mittelding zwischen Dauerpasteurisierung und Momenterhitzung. Die Vorteile der Kurzzeiterhitzung, besonders in den sog. Plattenapparaten mit Wärmeaustauscher, sind darin zu sehen, daß die Rohmilcheigenschaften im Vergleich zu allen anderen Verfahren am besten gewahrt bleiben und daß ihr Betrieb infolge Dampf- und Platzersparnis sehr wirtschaftlich ist.

Ein Nachteil liegt auf bakteriologischem Gebiet und betrifft den sog. „Sicherheitsfaktor". Dieser besteht darin, daß bezüglich Zeitdauer der Erhitzung und Temperaturgrad gewisse Schwankungen nach unten vorkommen dürfen, ohne daß die bakteriologische Wirkung hinsichtlich Abtötung von pathogenen und technisch schädlichen Keimen in Frage gestellt wird. Solche Schwankungen sind in einem praktischen Betrieb mitunter unvermeidlich und kommen dadurch zustande, daß z. B. die Stundenleistung etwas überschritten wird, wodurch sich die Erhitzungs- und Heißhaltezeit verkürzt, oder daß die Dampfzufuhr aus irgendeinem Grunde zurückgeht, wodurch sich die Temperatur erniedrigt. Bezüglich der Temperatur ist von Gesetzes wegen schon für einen Grad nach unten Sicherung gegeben, da bei der amtlichen Prüfung jeder Apparat schon bei 70° C den Bedingungen genügen muß. Nach unseren Erfahrungen haben wir in Weihenstephan aber auch bei 69° und 68° C keine lebenden Tuberkelbazillen mehr gefunden (soweit wir bei einzelnen Apparaten auch diese Temperaturversuche ausführten). Die Sicherheitszone ist um so geringer, je höher die Temperatur und je kürzer die Erhitzungs- und Heißhaltezeit ist, und um so größer, je tiefer die Temperatur und je länger die Erhitzungs- bzw. Heißhaltezeit ist. Darin liegt der Nachteil der Kurzzeiterhitzung und der Vorteil der Dauerpasteurisierung. Dies zeigt deutlich ein von Dahlberg (1932) gezeichnetes Diagramm.

Zur Gruppe der Kurzzeiterhitzer müssen auch noch die Elektropasteure gerechnet werden; denn die Abtötung der Bakterien erfolgt wohl weniger

1) Dieser konnte leider wegen Erkrankung des Referenten nicht abgehalten werden.

durch die Wirkung des elektrischen Stromes (Wechselstrom 220 Volt) als solchen, als durch die Hitze, die entsteht, wenn die zwischen den beiden Elektroden durchlaufenden Milchteilchen dem Stromdurchgang Widerstand leisten. Es kann also kein Milchteilchen der Hitzewirkung entgehen, weil es ja selbst Träger des Widerstandes ist. Infolge der totalen Erfassung ist auch die bakteriologische Wirkung hervorragend; im besonderen sollen auch Sporen, im günstigsten Falle bis zu 99,9 Proz., erfaßt werden (Devereux, 1929). Ob sich allerdings auch diese Wirkung durch die Hitze allein erklären läßt, ist fraglich. Fabian und Graham (1933) konnten jedenfalls bei alleiniger Anwendung entsprechenden Hochfrequenz-Wechselstroms (0,8 Amp., 10 Mill. Frequenz) eine typische Bakterienabsterbekurve erhalten.

Beim amerikanischen Electropure-Verfahren genügen etwa 12 bis 15 Sekunden, während denen die Milch von 45° C auf 70—75° C erhitzt wird, um die gewünschte Pasteurisierwirkung zu erreichen. Der Apparat nach Aten benötigt entweder höhere Voltzahl oder längere Durchflußzeiten (Terwen und Quelle, 1934). Den Vorteil des geringen Platzanspruches besitzen diese Apparate ebenfalls, die Wirtschaftlichkeit ist aber in den meisten Fällen durch die hohen Stromkosten in Frage gestellt.

Was nun die Pasteurisierwirkung selbst betrifft, so werden normalerweise bei sachgemäßem Vorgehen die pathogenen Erreger und die Vertreter der Coli-aerogenes-Gruppe restlos abgetötet, nicht jedoch die übrigen saprophytischen Keime. Auf eine völlige Abtötung aller saprophytischen Mikroorganismen kann bei Trinkmilch um so leichter verzichtet werden als ja diese nicht lange aufbewahrt, sondern möglichst bald verbraucht werden soll, noch bevor die überlebenden Keime Zeit gewonnen haben, sich wieder stärker zu entwickeln. Im Normalfall darf man damit rechnen, daß durch die Pasteurisierung etwa 99,0—99,9 Proz. der ursprünglich vorhanden gewesenen Keime vernichtet werden. Die „Pasteurisierwirkung“ eines Apparates ist jedoch keine unveränderliche Größe, sondern sie wechselt mit der Zusammensetzung der in der Milch vorhandenen Flora, die ihrerseits wieder von verschiedensten Umständen abhängig ist, wie z. B. Jahreszeit, Futter usw. Sind viel hitzebeständige Keime in der Milch, ist die prozentische Abtötung eine viel geringere als oben angegeben. Des weiteren hat sich gezeigt, daß die „Pasteurisierwirkung“ meist um so stärker ist, je keimreicher die Rohmilch vorher war, und um so schwächer, je keimärmer sie war. (Erfahrungen der beiden Forschungsanstalten in Kiel und Weihenstephan gelegentlich der seit 10 Jahren durchgeführten Erhitzerprüfungen; siehe auch Hussong und Hammer, 1931; Thurston und Olson, 1933). Dies hängt damit zusammen, daß sich in stark keimhaltiger Milch die Kleinlebewesen bereits im ansteigenden Wachstumsstadium befinden, in einem gewissen physiologischen Jugendzustand, in dem sie gegen Hitzeeinwirkung viel empfänglicher sind als wenn sie noch nicht angefangen hätten, sich zu vermehren. Der dem beginnenden Wachstum vorausgehende Ruhezustand ist aber kennzeichnend für solche Keime, die sich in sauber gewonnener und nach dem Melken gut gekühlter Milch befinden (Sherman und Stark, 1929). Daß auch andere Faktoren, wie z. B. die Milchperoxydase, die Hitzeabtötung beeinflussen können, und zwar im günstigen Sinne (Demeter und Eisenreich, 1937), sei nur nebenbei erwähnt.

Wie sich nun die wichtigsten Bakteriengruppen in den auf verschiedene Weise erhitzten Milchen prozentisch verteilen und wie diese Verteilung bezüglich Haltbarkeit zu beurteilen ist, soll an Hand eines Diagramms (Abb. 1, Demeter, 1936) kurz geschildert werden.

Durch die Dauerpasteurisierung verschiebt sich im Vergleich zur Rohmilch das gegenseitige Verhältnis zugunsten der Säurebildner, insbesondere der schwach säuernden Vertreter. Die anderen Bakteriengruppen treten praktisch völlig zurück. Durch die Kurzzeiterhitzung tritt im Vergleich zur rohen und dauerpasteurisierten Milch eine Schwächung der starken Säurebildnergruppe ein, gleichzeitig aber eine gewaltige relative Zunahme der schwachen Säurebildner, während die übrigen Gruppen auch hier noch stark zurücktreten, wenn auch nicht mehr im selben Ausmaß wie bei der dauerpasteurisierten Milch. Im Vergleich zu dieser ist sogar eine aufsteigende Bewegung zu verzeichnen. Die Zusammensetzung der bei 85° C momentpasteurisierten Milch läßt in gesteigertem Maße die bereits bei der kurzzeiterhitzten Milch angedeuteten Tendenzen erkennen, während sich die Erhitzung über 93° C hinaus auf die Säurebildner, insbesondere die starken (z. B. Strept. lactis), ganz katastrophal auswirkt, so daß also letzten Endes praktisch nur mehr die Eiweißzersetzer das Feld beherrschen. Für die Hocherhitzung 1 Minute bei 85° C standen mir leider keine Beobachtungen zur Verfügung, man dürfte aber nicht fehlgehen, wenn man sie in dem Diagramm in der Mitte zwischen der Momentpasteurisierung bei 85° C und der Erhitzung über 93° C anbringt, woraus sich ebenfalls bereits eine sehr ungünstige Verteilung der Arten ergibt, was durch die praktischen Erfahrungen bestätigt wird.

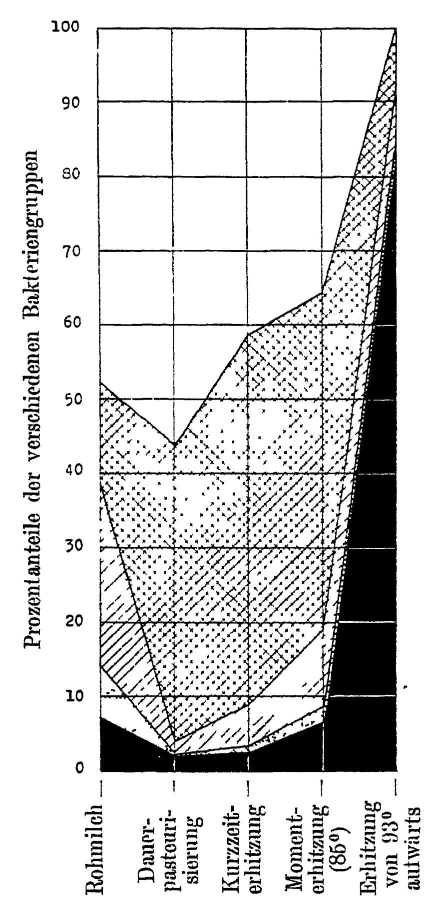


Abb. 1. Prozentische Verteilung der wichtigsten Bakteriengruppen in roher und nach verschiedenen Verfahren erhitzter Milch. (Aus Chemiker-Ztg. Jahrg. 60.)

Im großen ganzen kann man sagen, daß die überlebende Flora auf Grund ihrer prozentischen Verteilung in der erhitzten Milch ausschlaggebend dafür ist, welche Art Zersetzung bei längerer Aufbewahrung der Milch eintritt. Doch darf man den Temperaturfaktor hierbei nicht außer acht lassen.

Einige weitere physikalische Entkeimungsverfahren haben nur theoretisches Interesse, so z. B. Adsorption, Ultrafiltration, Ultrahomogenisierung, und zwar wegen der kolloidalen Struktur der Milch. Dagegen dürfte die Entkeimung durch Ultraschallwellen, ausgehend von den

Beobachtungen von Wood und Loomis (1927), größere praktische Bedeutung besitzen. Derartige Anlagen für Zwecke der Milchsterilisierung (und Homogenisierung) sind bereits in den Vereinigten Staaten, in der Hauptsache durch Chambers (1932, 1938), ausprobiert worden. Es konnte eine 80—100proz. Zerstörung der Bakterien beobachtet werden (Chambers und Gaines 1932). Die Leukozyten erleiden eine vollkommene Auflösung (Chambers 1938). Wichtig ist für den Abtötungsgrad nach Beard und Gantvoort (1938) das Volumen der Flüssigkeit, die Menge der Keime pro Volumeneinheit, sowie die Form und Größe der Mikroorganismen. Stäbchen werden rascher erfaßt als Kokken, große Stäbchen wiederum rascher als kleine. Yen und Liu (1934) konnten drei Gruppen von Bakterien, je nach ihrer Empfindlichkeit, unterscheiden: 1. praktisch resistente (Anthrax); 2. nicht restlos abgetötete (Bac. subtilis, Kokken und Streptokokken); 3. restlos abgetötete (Bact. coli, typhi dysenteriae und proteus, also anscheinend die gesamte Gruppe der gramnegativen Darmbakterien). Die soeben erwähnten Ergebnisse wurden jedoch nicht im Milchmilieu erhalten. Die Milch übt nach Beckwith und Weaver (1936) eine abschwächende Wirkung aus, auch konnten diese Autoren die erwähnten günstigen Ergebnisse von Chambers und Gaines nicht bestätigen. Als Ursache für die tödliche Wirkung der Ultraschallwellen darf wohl eine Zerreißung der Zellen infolge der bei der sog. „Kavitation" auftretenden Druckunterschiede angenommen werden. Die Enzyme der Milch werden nicht gleichmäßig beeinflußt, so wird z. B. Milchperoxydase inaktiviert (Matsudaira und Sato, 1934), ähnlich verhält sich die Phosphatase (Chambers, 1938), Pepsin wird aktiviert (Chambers, 1937).

Wir müssen nun nochmals auf die Elektrizität zurückkommen und kurz besprechen, inwieweit die Behandlung von Milch- und Milcherzeugnissen mit Ultrakurzwellen in Frage kommt. Varga (1937) hat nur in ⅓ der Fälle eine keimtötende Wirkung beobachtet (Reduktion bis zu 77 Proz.), Schmidt-Hoensdorf (1933) fand ein Wirkungsoptimum gegen Mastitisstreptokokken bei einer Wellenlänge von 3,6 m. Außer der thermischen Wirkung (Schmakowa, 1937) darf wohl noch mit einem spezifisch elektrischen Einfluß gerechnet werden (Liebesny und Mitarbeiter, 1933). Im übrigen wurde nicht bloß über negative Ergebnisse, sondern auch über eine stimulierende, sog. biopositive Wirkung berichtet, z. B. von Lentze (1932), Liebesny (1933), Lippelt und Heller (1934), Haché und Leunig (1936) und Wertheim (1937). Interessante Aufschlüsse darüber brachte jedenfalls der heute Vormittag von Herrn Schwartz erstattete Bericht. Immerhin kommt diesem Verfahren noch keinerlei größere Bedeutung für die Milchwirtschaft zu, da, abgesehen vom Mangeln einer praktisch brauchbaren Apparatur, auch die wissenschaftliche Seite noch weiterer Klärung bedarf.

Nun zur Entkeimung der Milch durch ultraviolettes Licht! Hier gilt in vermehrtem Maße das, was bereits über die abtötungshemmende Wirkung der Milch bei Ultraschallwirkung gesagt wurde. Die an und für sich stark bakterizide Wirkung der ultravioletten Strahlen wird schon in ganz geringer Schichttiefe (<1 mm) aufgehoben (Vogeler, 1930 u. a.), außerdem ergeben sich bei gleichzeitiger Sauerstoffanwesenheit unerwünschte geschmackliche Veränderungen. Trotz dieser Mißerfolge hat man aber diese Frage wieder aufgegriffen unter Konstruktion neuer Apparate, die es gestatten, daß darin bei genügend großer Stundenleistung die Milch in äußerst dünner Schicht während 40 Sekunden bestrahlt wird. Die von Weckel (1937) gefundene Keimreduktion in sehr bakterienreicher Milch betrug im Mittel nur rund 28 Proz., während Dennington (1937) über ein wesentlich besseres und auch praktisch brauchbares Ergebnis von 98 Proz. berichtete. Die größte Wirkung

wurde im Bereich von rund 2500 bis 2000 Ångström und sogar weniger gefunden. Ebenfalls günstige Ergebnisse wollen Vieilly und Harder (1937) mit einem anderen Apparat erhalten haben, bei dem die Milch im Vakuum in 0,01 mm Dicke über Quarzröhren herabfließt und nur $^1/_{10}$ Sek. lang bestrahlt wird. Erwähnt sei auch noch ein Patent der Fromray Parent Co. (1933), wonach die Milch durch eingetauchte Lampen mit ultravioletten und ultraroten Strahlen so lange bestrahlt wird, bis wenige Grade unter der Dauerpasteurisierungstemperatur erreicht sind. Nach Curran und Evans (1938) können Sporen durch vorausgehende Ultraviolettbehandlung für die Abtötung durch Hitze sensibilisiert werden. Dies wäre vielleicht einmal ein Weg, die durch keine molkereimäßige Behandlung erfaßbaren Sporen in der Milch zu vernichten. In Amerika hat man nun eine sog. „Todesstrahlenlampe" für Bakterien herausgebracht. Nach Rentschler und James (1938) sind die für den Menschen harmlosen Strahlen die im sog. 2337-Ångström-Einheitsband enthaltenen. Die daraus entwickelte, sehr wirtschaftlich arbeitende Lampe ist ursprünglich für die Luftentkeimung gedacht (99,99 Proz. Abtötung innerhalb weniger Sekunden), soll sich nach Garett und Arnold (1938) in der Milchwirtschaft jedoch nicht bloß für die Desinfektion von Kuhställen, Käsekellern usw. eignen, sondern auch für die Sterilisation von Kannen, Milchflaschen und anderen Geräten.

Zu den chemisch-physikalischen Methoden übergehend, sei erwähnt, daß sich Verfahren, die Wirkung der Oligodynamie zur Entkeimung heranzuziehen (z. B. Katadynisierung nach Krause, Elektrargent-Verfahren nach Gerber, 1934), für milchwirtschaftliche Zwecke nicht bewährt haben. Der Grund liegt nicht zum geringsten wieder in der kolloidalen Struktur der Milch. Die von Denier (1937) neuerdings empfohlene Milchentkeimung durch Ionisation geht sicher letzten Endes auch auf eine oligodynamische Wirkung hinaus, wenngleich die Keimreduktion nach seiner Vorstellung dadurch zustande kommen soll, daß die von dem Metall der Elektroden herrührenden Ionen eine Art Bakteriolyse herbeiführen.

Chemische Verfahren zur Konservierung von Milch haben infolge der Bestimmungen des Lebensmittel- und Reichsmilchgesetzes ihre Bedeutung verloren, wenn man von der Aufbewahrung unter Kohlensäure- oder Sauerstoffdruck absieht.

Nach Untersuchungen von Prucha und Mitarbeitern (1931) gelang es, durch Karbonisierung von frischer Milch, zunehmend mit steigendem Druck, die Bakterienentwicklung und Säuerung zu verzögern, und zwar um 1—8 Tage, entsprechend 0,66—4,0 atü. Beim 2½fachen (etwa 12 atü) des zur Konservierung alkoholfreier Getränke benötigten Druckes konnte die Weiterentwicklung der in frischpasteurisierter Milch vorhandenen Restflora bei 4,4° C vollkommen unterdrückt werden.

Ueber die Sauerstoffbehandlung der Milch unter Druck bei 8—10 atü und einer Temperatur von 6—10° C, das sog. Hofiusverfahren, ist schon eine Reihe von Arbeiten veröffentlicht worden. Aus den hauptsächlich an der Kieler Forschungsanstalt (1936/37) durchgeführten Versuchen geht hervor, daß frische Milch unter diesen Umständen ungefähr 4—5 Wochen haltbar gemacht werden kann. Die Stillegung der Bakterientätigkeit beginnt nicht sofort, mitunter tritt sogar noch eine Vermehrung ein. Nach van Beynum und Pette (1938) nimmt in der ersten Periode, die etwa 14 Tage dauert, die Bakterienkeimzahl ab, in der zweiten Periode setzt wieder eine Keimvermehrung ein durch Entwicklung eines schwach säuernden Diplokokkus. Diese kann aber auch ausbleiben. Rodenkirchen (1937) konnte die von Richter (1936) beobachtete vorzugsweise Abtötung der gramnegativen Kurz-

stäbchen nicht bestätigen. Richter nahm zur Erklärung der wachstumshemmenden Wirkung des Hofius-Verfahrens an, daß durch die Uebersättigung mit Sauerstoff die in den Enzymen vorhandenen sog. „freien Gruppen“ durch O_2-Anlagerung abgebunden und somit an der Erfüllung ihrer eigentlichen Funktion, der Wasserstoffaktivierung, verhindert würden. Die Notwendigkeit besonderer ernährungsphysiologischer Untersuchungen im Hinblick auf Brauchbarkeit dieser Milch als Kinder- und Säuglingsnahrung wird von der Kieler Anstalt besonders betont. Vorausgesetzt, daß das Verfahren diesbezüglich genügt, könnte es für die Praxis von ziemlicher Bedeutung werden. Es ließe sich die Belieferung von Milchläden in bestimmten Sektionen wesentlich vereinfachen, vielleicht auch eine Sonntagsbelieferung von Geschäften erübrigen oder wenigstens sehr stark einschränken. Weiterhin müßten folgende Dinge geklärt werden: Die Versorgung von Schiffen mit Frischmilcherzeugnissen, die Ausfuhr- und Einfuhrmöglichkeiten von Sahne und Milch, Belieferung der Tropen und Verwendungsmöglichkeit der Fässer beim Rücktransport (bei Ausfuhr und Einfuhr oder auch im Inland auf weite Entfernungen) für Waren verschiedener Art. Von wesentlicher Bedeutung würde es sein, wenn es gelänge, das Verfahren so zu entwickeln, daß die Aufbewahrung in den Tanks unter Sauerstoffdruck bei Zimmertemperatur ohne Nachteile erfolgen könnte.

Eine weitaus zweckmäßigere und bereits allgemein eingeführte Konservierung von Milch ist es jedenfalls, diese entweder im Vakuum zu kondensieren oder zu trocknen. Es würde zu weit führen, hierauf weiter einzugehen. Erwähnt sei nur, daß sowohl Kondensmilch, gezuckert oder ungezuckert, als auch Milchpulver in keiner Weise keimfrei sind. Es können, ohne übrigens dem Produkt zu schaden, mehrere Tausend Keime pro g vorhanden sein. Während aber die Frage der Kondensmilchhaltbarkeit in der Hauptsache bakteriologischer Natur ist, ist diejenige der Milchpulverhaltbarkeit vorzugsweise eine chemische Angelegenheit (Fettoxydation); denn der niedrige Feuchtigkeitsgehalt schließt hier das Wachstum von Mikroorganismen aus. Die Aufrechterhaltung des Feuchtigkeitsgehaltes und die größtmögliche Entfernung des schädlichen Sauerstoffs kann nach Mohr (1936) und Schweigart (1936/38) durch Pressen des lockeren Milchpulvers unter hohem Atmosphärendruck (140 atü) zu sog. Preßlingen herbeigeführt werden.

In gleicher Weise wie Frischmilch können auch Sauermilchprodukte durch Trocknung haltbar gemacht werden.

Wir gehen nun zur Butter über, müssen uns aber darauf beschränken, einige Gesichtspunkte herauszugreifen. Beginnen wir mit der Rahmsäuerung durch eine künstliche Säuerungskultur, den sog. „Säurewecker“. Die Rahmsäuerung bringt ohne Zweifel gewisse Vorteile. 1. hat man es besser in der Hand, eine immer gleichmäßige gute Ware zu erzeugen, 2. ist das Aroma kräftiger und pikanter, 3. ist die Butterung eine leichtere und die Ausbeute eine größere. Das Aroma wird durch besondere Aromastreptokokken gebildet, die sog. Betakokken Orla-Jensens. Als Aromastoff ist das Diazetyl festgestellt worden (Schmalfuss und Barthmeyer, 1929/32; van Niel et al., 1929), dessen Muttersubstanz wiederum das hauptsächlich beim Zitronensäureabbau (Hammer et al. 1933, Ritter und Stüssi, 1934) gebildete Azetoin, vielleicht aber auch das Azetaldehyd (van Beynum und Pette, 1938) ist. Mittlerweile ist auch auf die mögliche Beteiligung des intermediär bei der Zuckersäuerung entstehenden Methylglylyoxals hingewiesen worden (Pien, Baisse und Martin, 1936). Zur Aromabildung genügen ganz kleine Mengen Diazetyl, höchstens bis zu 5 g in 10 Tonnen Butter. Mit der Kenntnis

des wesentlichen Butteraromastoffes trat natürlich die Frage der künstlichen Aromatisierung auf den Plan. Es wurde beobachtet, daß die Zufügung von Zitronensäure (nicht mehr als 0,2 Proz.) zum Säurewecker oder Rahm eine besser beurteilte Butter ergab (Gorini, 1932; von Raffay, 1932; Templeton und Sommer, 1934). Was jedoch den gesetzlich unstatthaften direkten Zusatz des Diazetyls zu Butter betrifft, so hat Mohr (1933) über einen hierdurch verursachten fremden und unangenehmen Geschmack und schnelleres Verderben berichtet. Außerdem hat man es nicht in der Hand, was mit dem zugefügten Diazetyl weiter geschieht. Das Diazetyl kann wieder reduziert werden, wozu viele Bakterien in der Lage sind, oder aber sich mit dem Butterfett umsetzen und Talgigkeit hervorrufen (King, 1931; Ritter und Stüssi 1934). Dies stimmt vollständig mit den Erfahrungen Hunzikers überein, wonach ein gewisser Antagonismus besteht zwischen Aromagehalt und Haltbarkeit der Butter.

Nun kurz zur Frage der Dauerbutterherstellung, die ja in letzter Zeit auch bei uns in Deutschland im Vordergrund des Interesses steht. Die schwach oder gar nicht gesäuerte Butter hat sich hier der stark gesäuerten überlegen erwiesen. Es hat sich gezeigt, daß beim gleichzeitigen Vorhandensein von Milchsäure und Metallionen als Katalysatoren eine Oxydation des Fettes und Lezithins bewirkt wird und daß dieser Vorgang durch Salzgehalt eine wesentliche Förderung erfährt (Hunziker, 1935). Die Folge ist fischiger Geschmack oder mindestens Altgeschmack (Ritter, 1934/35 und andere). Diese Fehler treten auch bei Lagerungstemperaturen auf, die ein Bakterienleben ausschließen, nämlich von —10° C bis —21° C. Auch die fett- und eiweißspaltenden Enzyme können noch bei der Kaltlagerung tätig sein! Aus diesem Grunde ist schon bei der Milch- und Rahmgewinnung für möglichst geringen Bakteriengehalt zu sorgen!

Die größte Schwierigkeit für eine bakteriologisch saubere Butterbereitung liegt heute noch im hölzernen Butterfaß. Hier findet sich die letzte große Klippe, an der die Herstellung von Qualitätsbutter, wenn sonst alles in Ordnung ist, scheitern kann. Das Holz bietet die besten Unterschlupfmöglichkeiten für alle Butterschädlinge. Besondere Schlupfwinkel bieten die Zwischenräume von nicht genügend fest zusammengesetzten Brettern, die vielfach erst dann geöffnet werden, wenn der Butterfertiger, wie z. B. beim Kneten, größerer mechanischer Beanspruchung ausgesetzt wird (Olson und Hammer, 1933). Die Desinfektion mit chemischen Mitteln muß immer auch mit großer Hitzeeinwirkung kombiniert werden. Trotzdem gelingt es nicht, in einem Butterfaß die Bakterien in wünschenswertem Ausmaß abzutöten (Demeter und Christiansen, 1934 und weitere Untersuchungen in Weihenstephan 1937/39). Die Hefen und Schimmel dagegen können praktisch vernichtet werden. Im weiteren ist auch die Art des Holzes maßgebend, wie insbesonders von Christiansen (1934) und Marschall (1934) gezeigt wurde. Infolge dieser Unzuträglichkeiten ist es selbstverständlich, daß man sich auch nach anderem Material als Holz zur Herstellung von Butterfertigern umgesehen hat. Hansen hat 1933 von Versuchen mit einem Aluminiumfertiger berichtet, und auf der Milchwirtschaftlichen Ausstellung in Atlantic City im Oktober 1936 ist der erste brauchbare Metallbutterfertiger ausgestellt worden. Er weicht von der üblichen Form eines Butterfertigers vollkommen ab und besitzt die Gestalt eines Kubus. Eine Diagonale des Kubus ist die Achse. Demzufolge ergibt sich, da 6 Flächen vorhanden sind, bei einer Umdrehung eine Schlagzahl von 6 gegenüber 1 beim sonst üblichen Butterfertiger. Der Kubus ist innen vollständig leer und glatt, er besitzt auch keine Knetwalzen. Diese beiden Punkte sind es, die, vom bakteriologischen

Standpunkt aus betrachtet, diesen Butterfertiger als ideal erscheinen lassen. Die Walzen sind nicht notwendig, da der Apparat, nach Ablassen der Buttermilch, ohne weiteres auch knetet. Als weiterer Vorteil wird angegeben: Gleichmäßige Durcharbeitung, gleichmäßiger Wassergehalt und gutes Gefüge. Die Schwierigkeiten betreffs Wassergehaltseinstellung scheinen jedenfalls bei einem in Deutschland kürzlich ausprobierten ähnlichen Modell noch nicht behoben zu sein.

Wir verlassen nun die Butterbereitung und gehen zur Käserei über. Hier stehen zwei Fragen im Vordergrund des Interesses, nämlich die Beeinflussung der Käsereitauglichkeit der Milch durch Silagefütterung und die Möglichkeit der Käsereimilchpasteurisierung. Beide Probleme sind auch im Zusammenhang mit der Durchführung des Vierjahresplanes sehr wichtig und betreffen in der Hauptsache die Hartkäserei. Von vorneherein sei gleich betont, daß für die Käsereitauglichkeit der Milch keineswegs bloß die Mikroflora verantwortlich ist, sondern eine Reihe von unkontrollierbaren Faktoren, die mit der Milchzusammensetzung zu tun haben und letzten Endes den von Henneberg als „Disposition" bezeichneten Zustand bedingen (Hüttig, 1934). Die Schwierigkeiten liegen in zwei Tatsachen begründet: 1. hat sich nach neueren Untersuchungen von Grimmer und Rodenkirchen (1938) an Tilsiter-Käsen gezeigt, daß in der Silomilch das Säuerungsvermögen stark herabgesetzt ist und daß in den mißratenen Käsen die starken Säurebildner zugunsten der schwachen Säurebildner zurückgedrängt sind. Eine normale Säuerung ist aber die erste Voraussetzung für jede Käsereifung. 2. hat sich nach einer großen Anzahl von Untersuchungen, die ihren Ausgang von der Schweiz genommen haben (Kürsteiner, 1922; Dorner, 1926; Hofstettler, 1936 u.a.) gezeigt, daß es die mit dem Kuhkot in die Milch gelangenden Buttersäurebazillen sind, die bei der Gärung im Heizkeller die Emmentalerkäse durch Bildung von Kohlensäure und Wasserstoff schwammig auftreiben und durch Buttersäurebildung ungenießbar machen. Es sollen schon wenige Sporen pro kg frischen Käses genügen, um dessen Reifung auf die eben beschriebene Weise ungünstig zu beeinflussen. Nun weisen aber die an unserer Anstalt während der letzten 5 Jahre durchgeführten Untersuchungen darauf hin, daß der Gehalt an anaeroben Sporenbildnern und das Auftreten dieses Käsefehlers nicht immer parallel gehen. Wir haben Emmentalerkäse in Händen gehabt, die solche Fehler nicht aufwiesen, dennoch aber einen hohen Anaerobiengehalt hatten, und umgekehrt. Hier liegt unserer Ansicht nach der Punkt, wo die weitere Forschung anzusetzen hat. Die im folgenden von mir geäußerte Ansicht ist noch hypothetisch und keineswegs bewiesen. Wir wissen aus den Untersuchungen von Gorini (1927, 1929, 1936, 1937), Orla-Jensen und Jacobsen (1930) u. a. daß schlechte Säuerungsfähigkeit von Milch durch Mangelerscheinungen bedingt sein kann. Gorini hat eine solche käsereiuntaugliche Milch „disgenetische" Milch genannt. Die Untauglichkeit kann durch gewisse Stoffe (Pepton, Kuhmistextrakt, Hefeextrakt) aufgehoben werden. Weitere Untersuchungen von Orla-Jensen und Mitarbeitern (1936), Eagles und Mitarbeitern (1936/38) sowie Möller (1938) haben insbesonders die Notwendigkeit von Laktoflavin und Bios für das Wachstum der echten Milchsäurebakterien dargetan, während z. B. die Coli-aerogenes-Gruppe diese Aktivatoren nicht benötigt. Auf der anderen Seite wird, wiederum im Gegensatz zum Strept. lactis (Rahn und Hegarty, 1938), die Coli-aerogenes-Gruppe durch Askorbinsäure sogar gehemmt (Thurau, 1935), durch gewisse Aminosäuren und insbesonders Indolessigsäure (Heteroauxin) dagegen deutlich stimuliert (Soule und Gehring, Ball, Beckwith und Geary, 1938). Milch-

säurestreptokokken sind wiederum in der Lage, das für die Coli-aerogenes-Gruppe nicht günstige Vitamin C selbst zu bilden (Palladina und Anoschkina, 1937). Die Fütterung hat nun ohne Zweifel einen großen Einfluß darauf, inwieweit solche Stoffe in der Milch vorhanden oder nicht vorhanden sind, worauf schon im Zusammenhang mit der disgenetischen Milch Gorini (1929) hingewiesen hat. Es wäre wichtig, solche Untersuchungen mit der Silagefütterung anzustellen. Fehlt in der Silagemilch z. B. ein für die Milchsäurebakterien notwendiger Aktivator, dann haben wir den Fall der langsam säuernden Milch vor uns. Im weiteren sei auch an die bakterienfeindliche Wirkung von Fermenten, insbesondere der Oxydasen, erinnert (Glaser und Mitarbeiter, 1928/1930), deren Gehalt in der Milch mit dem Futter wechselt (Hanssen, 1924; Chraszcz und Goralowna, 1927 u. a.). Auch die Beobachtungen von Boas und Mitarbeitern (1932, 1935, 1936) über die in gewissen Pflanzensäften vorhandenen bakterizid wirkenden Substanzen, wie z. B. Anemonin, spielen hier herein, da wir wissen, daß Giftstoffe vom Blut in die Milch übergehen.

Was nun die Entwicklung der Buttersäurebazillen im Emmentalerkäse betrifft, so wird sie ohne Zweifel schon dadurch gefördert, daß die Milchsäuregärung nicht ganz normal verlaufen ist. Bei den Buttersäurebazillen wirkt das Vitamin C wahrscheinlich als Katalysator (Kligler und Guggenheim, 1938). Ich verweise in diesem Zusammenhang auch auf den gestern nachmittags von Herrn Büsing erstatteten Bericht über die Wachstumsaktivierung von Anaerobien durch Askorbinsäure und andere regulierende Stoffe. Ein im Kartoffelextrakt vorhandener, nicht genauer bekannter Stoff erzeugt im Kulturgut eine heftige Buttersäuregärung (Tatum und Peterson, 1933). Vielleicht findet sich eine ähnliche Substanz auch in gewissen Silagefuttersorten und geht dann ins Blut und die Milch über. Ein weiterer Punkt ist folgender: Nach Habs (1937), Keil und Weyrauch (1937) bildet das für Kaltsilage typische Bact. acetylcholini, das nach Auffassung der Milchbakteriologen mit dem Streptobact. plantarum identisch ist, Azetylcholin. Andere Bakterien, z. B. Bact. coli, können nach Brühl und Mitarbeitern (1937) wiederum Histamin bilden. Wenn solche hormonale Stoffe nun auf dem Umwege über das Silofutter und das Blut in die Milch gelangen, ist, falls keine Mangelerscheinungen vorliegen, die Frage aufzuwerfen: Wie werden dadurch die für die Tilsiter- und Emmentaler-Käsereifung wichtigen Bakterien beeinflußt? Erfahren vielleicht die Buttersäurebazillen dadurch eine Förderung? Ich habe mich seit 2 Jahren bemüht, dieses Problem aus dem Gebiet der Spekulation herauszunehmen und auf festeren experimentellen Boden zu stellen, konnte aber bis jetzt leider keinen geeigneten Mitarbeiter finden.

Nun zur Frage der Käsereimilchpasteurisierung! Als vorteilhaft erscheint folgendes: 1. Abtötung der schädlichen Gasbildner (Coli-aerogenes-Gruppe). 2. Die damit Hand in Hand gehende Umwandlung von fabrikationsunsicherer Milch in eine fabrikationssichere. 3. Eine gewisse Stetigkeit der Käseerzeugung. Es war immer schon ein Kampf gegen den Verderb, den man mit der Käsereimilcherhitzung im Auge hatte. Nun dürfen aber die erhitzten Käse den guten Rohmilchkäsen bezüglich der charakteristischen Eigenschaften nicht nachstehen. Festzuhalten hierbei ist folgendes: 1. dürfen durch die Erhitzung die Rohmilcheigenschaften nicht so weit verändert werden, daß Labungsfähigkeit und das spätere „Kernen“ darunter leidet, 2. dürfen die für die Reifung wichtigen Bakterien nicht sämtlich abgetötet werden oder sie müssen in irgendeiner Form der erhitzten Milch wieder zugefügt werden.

Diese Forderungen können leicht bei den Weichkäsen, zum befriedigenden Teil auch bei den halbfesten Käsen erfüllt werden. Das gleiche gilt bei den Hartkäsen für den Cheddar. Ich verweise in diesem Zusammenhang auf meinen Generalbericht beim Weltmilchkongreß in Berlin 1937. Anders liegen die Verhältnisse beim Emmentaler. Er ist gegen jede Veränderung der Milch, sei sie physikalischer, chemischer oder bakteriologischer Natur, außerordentlich empfindlich. Dies ist der Grund dafür, daß der Prozentsatz des Ausschusses, der auch bei Rohmilchkäsen im sog. „Originalgebiet" anfällt, mitunter bis zur Hälfte der Erzeugung betragen kann. Infolgedessen wäre es ein großer wirtschaftlicher Vorteil, wenn man die Unsicherheit der Fabrikation durch entsprechende Erhitzung der Milch beheben könnte. In anderen Gegenden, insbesonders im Flachland, gelingt es auch mit Rohmilch nicht, Emmentaler guter Qualität herzustellen. Bis jetzt war noch nicht klar, ob die Schwierigkeiten mehr auf chemisch-physikalischem oder bakteriologischem Gebiet liegen. Daher haben wir vor bald zwei Jahren begonnen, zunächst mal die bakteriologische Seite aufzuklären, und zwar mit besonderer Berücksichtigung der verschiedenen Milchsäurebakteriengruppen und der Propionsäurebakterien. Auch die Buttersäurebakterien wurden miteingeschlossen. Bei den sowohl in Weihenstephan wie in Weiler i. Allgäu durchgeführten Käsungsversuchen handelte es sich darum, vergleichend aus derselben Milch Emmentalerkäse herzustellen, von der die eine Hälfte im rohen Zustande und die andere Hälfte im pasteurisierten Zustande zu je 1 Laib verarbeitet wurde. Hierbei war zu verfolgen, wie sich im Laufe der Reifung die Bakterienflora schrittweise verändert. Auftretende Unterschiede sollten einen Anhaltspunkt darüber geben, welche für die normale Reifung wichtigen Bakteriengruppen unter Umständen im pasteurisierten Käse eine andere Entwicklung nehmen als im Rohmilchkäse. Daraus kann geschlossen werden, welche Bakterienkulturen der erhitzten Milch nachträglich zugefügt werden müssen, damit die Reifung im pasteurisierten Käse denselben Verlauf nimmt wie im Rohmilchkäse. Sollten sich wenig Unterschiede zeigen, wäre zu schließen, daß die Schwierigkeiten der Herstellung von Emmentalerkäse aus erhitzter Milch weniger auf bakteriologischem Gebiete liegen als auf chemisch-physikalischen Veränderungen infolge des Erhitzens der Milch. Die Auswertung der Versuche ist noch im Gange. Ueber das Ergebnis wird an anderer Stelle berichtet werden.

Nun zum Schluß noch kurz ein paar Worte zur bakteriologischen Methodik! Wir haben in der deutschen Milchwirtschaft für die Keimzählung der Milch schon seit Jahren den Fleischextrakt-Peptonlaktoseagar eingeführt und die Bebrütung bei 30° C während zwei Tagen. Es ist über die Frage, welche Art Nähragar und welche Bebrütungstemperatur in den letzten Jahren sehr viel geschrieben worden, besonders in Amerika (Bowers und Hucker, Yale, Breed usw.). Nachdem sich durch diese Untersuchungen gezeigt hat, daß ein mit Zucker versetzter Agar gleichmäßigere Werte und höhere Kolonienzahlen ergibt, hat man sich dort entschlossen, mit 1. Juli 1939 den gewöhnlichen Standardagar fallen zu lassen und den von Bowers und Hucker ausgearbeiteten Trypton-Glukose-Magermilchagar offiziell einzuführen. Der Milchzusatz soll den Agar noch mehr dem natürlichen Milieu angleichen. Nach unseren Untersuchungen (Demeter und Löweneck, 1936) werden mit dem Trypton-Glukoseagar ungefähr gleich viel Kolonien erhalten, wie mit unserem Laktoseagar; die Kolonien selbst sind aber etwas größer und leichter zu zählen. In diesem Punkte hätten sich also die in Deutschland und Amerika angewandten Methoden aneinander angeglichen, im Sinne des

Standardisierungskomitees, das beim vergangenen Weltmilchkongreß in Berlin auf mein Betreiben ins Leben gerufen worden ist. Obwohl nun auch die amerikanischen wie die deutschen Untersuchungen einheitlich ergeben haben, daß die Temperatur von 37° C wesentlich ungünstiger für die allgemeine Keimentwicklung ist, als die näher bei 30° C liegende Temperatur (32° C), hat man sie in U. S. A. beibehalten. Es waren zweifellos regionale Gründe dafür maßgebend, zusammenhängend mit der besonders im Sommer wesentlich höheren allgemeinen Temperatur des größten Teiles dieses Landes.

Als Abschluß möchte ich Ihnen eine Modifikation der Abklatschmethode vorführen, die wir unter Verbesserung der Cziszárschen Apparatur (Csiszár, 1935) kürzlich unter Mitarbeit der Firma Gerber u. Co., Leipzig, entwickelt haben. Das Prinzip besteht darin, daß aus V2c-Stahl gepreßte Mikrometallschälchen, in einem staubdicht verschließbaren Behälter sterilisiert und dann mit dem entsprechenden Agar gefüllt werden, so daß sich ein kleines Polster vorwölbt. Die Fläche des Polsters beträgt 10 qcm. Zum Gebrauch werden die Schälchen an Ort und Stelle mit desinfizierten Fingern entnommen, mit sanftem Druck auf die zu prüfende Oberfläche gepreßt und dann wieder ins Gehäuse zurückgebracht. Die Bebrütung erfolgt in diesem Gehäuse wie üblich. Auf diese Weise lassen sich alle Flächen, sei es nun das Innere einer Milchkanne, eines Butterfertigers oder einer Milchleitung, aber auch Wände und jedes andere Material einschließlich Körperteilen (ich erinnere an Melkerhände!) mit einer für die Praxis genügenden Genauigkeit bakteriologisch prüfen. Wichtig ist die erzieherische Seite, weil das Ergebnis auch für einen bakteriologisch nicht ausgebildeten Laien äußerst anschaulich ist.

23. M. Gundel (Gelsenkirchen):

Die Beschaffenheit der Verkaufsmilch im Rheinisch-Westfälischen Industriegebiet in gesundheitlicher Hinsicht [1]).

Zahlreiche an uns herangebrachte Klagen und eigene Beobachtungen veranlaßten uns, zunächst im Sommer 1937 durch unsere Mitarbeiterin Dr. Bender und dann im letzten Winter 1938/39 durch Herrn Kollegen Wehr umfassende Untersuchungen über die Beschaffenheit der Verkaufsmilch im rheinisch-westfälischen Industriegebiet durchzuführen, in einem Gebiet mit einer Bevölkerung von etwa 7 Millionen Menschen, von denen der überwiegend größte Teil der Arbeiterbevölkerung angehört, deren Versorgung mit einer qualitativ hochwertigen Milch eine der selbstverständlichsten Forderungen der Hygiene sein sollte und da zudem in diesem Industriegebiet der Milchverbrauch pro Kopf der Bevölkerung größer ist als in anderen Teilen Deutschlands. Die von uns sowohl im Sommer als auch im Winter in Stadt und Land durchgeführten Untersuchungen haben leider sehr wenig erfreuliche Zustände aufgedeckt.

Im Rahmen dieser kurzen Ausführungen kann ich die verschiedenartigen Ergebnisse nur kurz streifen, möchte aber gerade in diesem Kreise die Dringlichkeit der Sanierung dieses Problems besonders herausstellen.

1) Aus dem Hygienischen Institut des Ruhrgebiets zu Gelsenkirchen (Direktor: Prof. Dr. med. et phil. Max Gundel).

I.

Der Keimgehalt der Verkaufsmilch zeigte bei den Untersuchungen im Sommer einen Durchschnittswert von über 86 Millionen Keimen pro ccm. Fast die Hälfte der Sommerproben hatte einen höheren Keimgehalt als 100 Millionen. Im Winter stellten wir einen Durchschnittskeimgehalt von etwas über 2½ Millionen Keimen pro ccm fest. Sämtliche von uns untersuchten Milchproben waren pasteurisiert. Der Keimgehalt der aus den Molkereien herauskommenden Milchproben zeigte im Sommer einen Durchschnittskeimgehalt von etwa 50000 und im Winter einen solchen von etwa 10000. Unsere Untersuchungen beweisen, daß die groben bakteriellen Verunreinigungen bei der pasteurisierten Verkaufsmilch erst auf dem Wege von der Molkerei zum Verbraucher erfolgen. Die Bakterienflora ist in der Verkaufsmilch völlig geändert gegenüber der Rohmilch, die zur Molkerei gelangt oder die in rohem Zustande verkauft wird. Diese Aenderung der Bakterienflora ist zurückzuführen auf die Verminderung der Säurebildner durch die Pasteurisierung und auf die starke Zunahme der Nichtsäurebildner nach der Pasteurisierung durch Vermehrung dieser überlebenden Keime bzw. sekundäre Verunreinigungen. Naturgemäß sind in den einzelnen Verkaufsstellen die Verunreinigungen sekundärer Art nicht gleichmäßig stark. Wenigen guten stehen aber zahlreiche schlechte Verkaufsstellen gegenüber, wo insbesondere durch die verunreinigten Kannen immer wieder neue massive Infektionen erfolgen. Bedenkt man, daß in den englisch sprechenden Ländern ein Keimgehalt in der Verkaufsmilch von etwa 100000 nicht überschritten werden darf und daß wir in unserer Verkaufsmilch im Sommer meistens über 100 Millionen und im Winter oft mehrere Millionen Keime im ccm nachweisen, dann folgert, daß noch eine umfangreiche Arbeit zu leisten ist. Dabei kann man in keiner Weise von überspitzten Forderungen sprechen, denn wir haben immer wieder feststellen können, daß sauber und einwandfrei arbeitende Betriebe durchaus in der Lage sind, eine pasteurisierte Verkaufsmilch dem Verbraucher mit einem Keimgehalt von weniger als 100000 pro ccm zu liefern.

Das Colivorkommen als Test für das Vorliegen von Verunreinigungen mit menschlichen oder tierischen Abgängen zeigt gleichfalls, wenigstens in unserem Industriegebiet, recht ungünstige Verhältnisse auf. Sowohl im Sommer als auch im Winter fanden wir in allen Verkaufsproben Colibazillen, im Sommer nicht selten noch in $^1/_{100000}$ ccm und darüber. Im Winter waren die Verhältnisse naturgemäß etwas günstiger. Jedoch ist bemerkenswert, daß wir in ⅓ aller Verkaufsmilchproben mehr als 1000 Colikeime im ccm fanden. Wenn in den englisch sprechenden Ländern Colifreiheit in der pasteurisierten Milch verlangt und durchgesetzt wird und wenn wir in unserer pasteurisierten Verkaufsmilch ausnahmslos und zum Teil in großen Mengen Colibazillen finden, andererseits aber in einwandfreien Betrieben die Möglichkeit auch des Vertriebes einer colifreien Milch feststellen können, dann ist auch hier noch umfangreiche, aber unerläßlich notwendige Arbeit zu leisten. Ich bemerke nebenbei, daß wir in einer der untersuchten Wintermilchproben auch Paratyphus B Schottmüller-Bazillen nachweisen konnten, die auch sonst bakteriell außerordentlich stark verunreinigt war.

In seuchenhygienischer Hinsicht ist bemerkenswert, daß keine der zum Verkauf gelangten pasteurisierten Milchproben — mit der einen Ausnahme — pathogene Darmbakterien enthielt, in keiner Probe wurden Abortus Bang-Bazillen oder Tuberkelbazillen nachgewiesen. Die seuchenhygienische Arbeit ist also günstig, die hygienische Leistung nach der Pasteurisierung aber völlig mangelhaft. Einschalten möchte ich noch, daß wir wie im Sommer so auch im Winter in etwa ⅓ aller Proben hämolysierende Streptokokken

fanden, die nach unseren serologischen Untersuchungen mit den Typen übereinstimmten, die wir vom Menschen aus Krankheitsprozessen isoliert hatten. Hieraus ergibt sich zum mindesten für unser Gebiet, daß ein Großteil dieser hämolytischen Streptokokken wahrscheinlich nicht aus tierischen Krankheitsprozessen stammt, sondern vom Menschen.

Die wichtigsten von uns aufgedeckten Infektionsquellen bestehen heute kaum noch in den Infektionen bei der Milchgewinnung und Milchbearbeitung als vielmehr im Milchvertrieb nach der Pasteurisierung. Vom hygienischen Standpunkt aus müssen wir feststellen, daß die hervorragende Arbeit der Milchwirtschaftler und Veterinärmediziner sich bis zu den Molkereien auswirkt, daß aber von hier ab Mißstände vorliegen, die unser Eingreifen verlangen, da es sich stets um vermeidbare Infektionsquellen handelt. Ich schlage vor, daß nun endlich die Zusammenarbeit von Milchbakteriologen, Veterinärmedizinern und Hygienikern geschaffen wird, die wir schon immer verlangt haben (Pfannenstiel u. a.) und deren Notwendigkeit wenigstens in unserem Gebiet auch von allen drei Stellen anerkannt wird.

Die Probleme des Melkermangels, der Landflucht usw. sind mir wohl bekannt. Sie sind aber bedeutungslos insofern, als diese groben Milchverunreinigungen auch schon vorher bestanden haben. Der Milchwirtschaftler muß mehr als bisher außer der geschmacklichen und äußeren Beschaffenheit der Milch, außer der physikalischen und chemischen Untersuchung auch die Fragen der bakteriellen Qualität der Verkaufsmilch berücksichtigen. Es erscheint mir am richtigsten, wenn diese Zusammenarbeit nach Provinzen geregelt und dann unter Umständen gebietsmäßig für einzelne Institute untergeteilt wird, die stichprobenweise die Qualität der Verkaufsmilch zu prüfen haben und die dann bei ungünstigen Befunden rückläufig bis zum Produzenten die Verunreinigungsquelle feststellen und beseitigen.

II.

Abschließend sei noch eine praktisch wichtige Beobachtung mitgeteilt, der wir in gemeinsamen Untersuchungen mit den Herren Weinstein und Wehr nachgegangen sind. Im Industriegebiet ist die Unsitte weit verbreitet, Säuglingen und Kleinkindern eine Milch zur Verfügung zu stellen, die am frühen Morgen abgekocht und in Thermosflaschen übergeführt wird. Mit dieser Milch werden dann die Kinder den Tag über versorgt. Ich erinnere in diesem Zusammenhang an die klassischen Untersuchungen von Flügge über die Cholera nostras und über die Bedeutung der thermoresistenten sporenbildenden Bakterien der Milch. In sehr umfangreichen Untersuchungen haben wir gemeinsam feststellen können, daß eine solche Thermosflaschenmilch, die länger als 3 Std. einer Temperatur von über 50° C ausgesetzt ist, eine nachweisbare Säuerung erfährt, ohne daß die Milch makroskopisch erkennbar verändert ist. Während der Erhitzung und in der nachfolgenden Bebrütungszeit kommt es zu einer riesenhaften Vermehrung der thermoresistenten und zum Teil auch thermophilen Stäbchenbakterien, zum Teil auch zu einer nachweisbaren Bildung von giftigen Leibessubstanzen dieser Mikroorganismen. Nach unseren hier nur ganz kurz mitgeteilten Untersuchungen erscheint es uns unbedingt notwendig zu sein, weiteste Bevölkerungskreise vor dem Gebrauch einer derartigen, in Thermosflaschen aufbewahrten Milch zu warnen, vor allem dann, wenn diese Milch der Ernährung von Säuglingen und Kleinkindern dient. Auch die mehrfache Erhitzung einer solchen Milch durch das vielgeübte sogenannte „Aufwärmen“ ändert nichts an der überaus ungünstigen bakteriellen Beschaffenheit. Ich habe dieses Beispiel im Rahmen meiner Ausführungen nur gewählt, um zu zeigen, in welchem Ausmaß in breitesten

Kreisen der Bevölkerung noch Unsitten in der Behandlung wichtiger Nahrungsmittel geübt werden, deren Abstellung anzustreben ist, die aber oft nur erkannt werden, wenn gerade auch der Hygieniker und Mikrobiologe immer wieder draußen unter dem Volk Sitten und Gebräuche beobachtet.

III.

Die Milch als eines der wichtigsten Volksnahrungsmittel besitzt heute noch nicht in der Verkaufsmilch die von uns unbedingt zu fordernde hygienische Eignung. Die Möglichkeiten ihrer Verbesserung sind vorgezeichnet, die Wege müssen nur begangen werden und hierfür ist nach den Erfahrungen der letzten Jahrzehnte die Einschaltung des Hygienikers dringend geboten, da ja ohne ihn bisher nicht die unerläßlich notwendige günstige Beschaffenheit der Verkaufsmilch erzielt werden konnte. Man braucht nur das Milchgesetz durchzulesen, um zu wissen, an welchen Stellen der dort bisher überhaupt nicht erwähnte Hygieniker eingeschaltet werden muß.

24. Adolf Janoschek (Weihenstephan b. München):

Mikrobiologie der Emmentaler Käserei[1].

Die bakteriologischen Vorgänge im Emmentaler Käse, die in ihrer Gesamtheit im Laufe von etwa 3—6 Monaten die Reifung bedingen, sind trotz vieler Forschungen noch lange nicht hinreichend studiert. Durch die grundlegenden Arbeiten von v. Freudenreich (6), Orla-Jensen (11), Burri (1, 2) und anderen sind uns wohl die wichtigsten im Emmentaler Käse vorkommenden Bakterien in ihrer Art und Wirkung bekannt. So sind die Milchsäurebakterien vor allem für den ersten Teil des Reifungsprozesses von besonderer Bedeutung, indem sie durch den Zuckerabbau die Käsemasse säuern und sogar noch nach ihrem Absterben durch die Fermente das Eiweiß angreifen. Sie sind auf diese Art vor allem Wegbereiter für später aufkommende Bakteriengruppen. Ein wesentlicher Anteil an der Reifung des Emmentaler Käses vor allem bezüglich Lochbildung und Aroma, dürfte den erst im späteren Verlauf der Reifung auftretenden Propionsäurebakterien zukommen, die Orla-Jensen interessanterweise auch in alten Käsen immer zahlreich feststellen konnte. Während van Niel (10) deren Systematik grundlegend behandelt hat, haben Burri und Mitarbeiter sowie Sherman (16) sich eingehend mit ihrer Bedeutung im Emmentaler Käse beschäftigt. Trotz alldem wissen wir noch viel zu wenig über die Wechselwirkung, das Hand-in-Handarbeiten, der verschiedenen Bakterienarten. Auch läßt sich der Reifungsprozeß des Emmentalers heute noch nicht künstlich, d. h. mit Reinkulturen, befriedigend reproduzieren.

Durch die vorliegenden, im Rahmen des Vierjahresplanes durchgeführten Untersuchungen sollte zunächst das Verhalten der Milchsäurebakterien von der Kesselmilch ausgehend bis zum 6 Monate alten reifen Käse studiert und gleichzeitig die Entwicklung der Propionsäurebakterien erfaßt werden. Die Untersuchungen wurden teils an der Süddeutschen Forschungsanstalt für Milchwirtschaft in Weihenstephan mit einem für Emmentaler Käse wenig

---

1) Aus der Bakteriologischen Abteilung der Süddeutschen Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Weihenstephan (Vorstand: o. Prof. Dr. Karl J. Demeter).

geeigneten Milcheinzugsgebiet, teils in der Lehr- und Versuchsanstalt für Emmentaler Käserei in Weiler, demnach in dem für die Herstellung von Emmentaler vorzüglich geeigneten Allgäu, durchgeführt. Die Ausführungen umfassen die Untersuchung von 6 Käsen aus Weihenstephan und 4 Käsen aus Weiler und sind als vorläufige Mitteilung zu betrachten.

Die bakteriologische Technik muß im Zusammenhang mit den Ergebnissen erwähnt werden. Um den Bruch bzw. die Käsemasse unter völliger Ausschaltung störender Infektionen für die Keimzahlbestimmung nach dem Verdünnungsverfahren vorzubereiten, wurde von diesen 1 g im Glasmörser nach Seifried (15) mit 9 ccm steriler n/10 Na_2CO_3-Lösung fein zerrieben. 40 Stöße sind reichlich genügend, um die Käsemasse in eine homogene Suspension zu verwandeln. Diese äußerst feine Verteilung der Käsemasse mag auch die Ursache sein, daß im Gegensatz zu vielen anderen Autoren weit höhere Keimzahlen erhalten wurden. Inwiefern diese von der Art und Feinheit der Zerteilung der Käsemasse abhängen, hat erst kürzlich J. Harrison (7) an Cheddarkäse gezeigt. Er erhielt bei entsprechendem Homogenisieren der Käsemasse bis zehnmal mehr Keime gegenüber dem einfachen Verreiben im Proberöhrchen oder in der Reibschale. Auch das Verreiben mit Sand ist vollkommen ungeeignet, da dadurch viele Bakterienzellen zerstört werden. Die Milchsäurebakterien wurden mit Hilfe der Verdünnungsmethode auf Milch-Pepton-Milchzucker-Agar nach Kuntze (8) erfaßt, und zwar wurden nach 2 Tagen die bei 45° und nach 4 Tagen die bei 30° angegangenen Kolonien gezählt und weiterverarbeitet.

Zur Zählung der Propionsäurebakterien gelangte ein verbessertes Verfahren zur Anwendung, so daß diese auch auf Petrischalen zu zählen waren. Als Nährboden diente Hefe-Pepton-Laktat-Agar nach Dorner und Thöni (4), dem kurz vor dem Gießen der Platten 5 Proz. einer 0,5proz. Natriumsulfitlösung nach Manteufel (9) zugesetzt wurden. In die Platten kamen etwa 20 ccm von diesem Nährboden als Kulturschicht, die nach ihrem Erstarren noch mit einer Deckschicht vom gleichen Nährboden überschichtet wurde. Rodenkirchen (14) hat für die Deckschicht Wasseragar verwendet. Zur Schaffung anaerober Verhältnisse wurde in die Petrischale abschließend noch steriles Paraffinöl — etwa 3—4 mm hoch — eingegossen. Die zweite Agarschicht, oben Deckschicht genannt, sollte das Flächenwachstum gewisser Organismen zwischen Agar und Paraffinöl verhindern und außerdem das Oel von der eigentlichen Kulturschicht fernhalten. Diese Art des Anaerob-Haltens hat den Vorteil, daß die dem langsamen Wachstum der Propionsäurebakterien entsprechend 14 Tage bei 30° bebrüteten Petrischalen später bequem weiterverarbeitet werden konnten (gegenüber der Kultur in hoher Schicht in Röhrchen). Zu diesem Zweck wurde das Paraffinöl abgegossen und die sterile Agarschicht ließ sich leicht in großen Flächenstücken von der darunterliegenden Kulturschicht abheben. Diese war dadurch vollkommen frei von Paraffinöl.

Zu welcher Zeit jeweils Proben gezogen und untersucht wurden, ist zugleich mit den Ergebnissen aus der folgenden Tabelle ersichtlich. Diese enthält nur die Durchschnittswerte, und zwar gesondert für die 6 Käse aus Weihenstephan und die 4 Käse aus Weiler. Dies schien geboten, da die Käse aus dem Allgäu (Weiler) von weit besserer Qualität waren.

Bei der vergleichenden Betrachtung der Ergebnisse fällt zunächst auf, daß trotz den Qualitätsunterschieden die Entwicklung der 3 Bakteriengruppen in den Käsen kaum wesentlich verschieden war. Zunächst zeigten sowohl die Milchsäurebakterien als auch die Propionsäurebakterien während dem ca. ¾ Std. (bei etwa 32°) dauernden Vorkäsen ein starkes Ansteigen.

Werte in Millionen per Kubikzentimeter bzw. Gramm.

Probenahme	Durchschnitt von 6 Käsen aus Weihenstephan			Durchschnitt von 4 Käsen aus Weiler		
	Milchsäurebakterien		Propion-säure-bakterien	Milchsäurebakterien		Propion-saure-bakterien
	bei 30° gewachsen	bei 45° gewachsen		bei 30° gewachsen	bei 45° gewachsen	
Kesselmilch	34,4	0,9	0,003	5,4	0,1	0,003
Kesselmilch mit Lab .	46,4	2,2	0,003	5,7	0,4	0,002
Bruch vor dem Brennen	374,9	27,7	0,023	135,0	6,8	0,010
Bruch nach d. Brennen	645,6	21,1	0,048	14,6	2,8	0,009
Nach 12 Std.	559,3	34,4	0,002	1596,0	598,0	0,002
Nach 24 Std.	603,3	703,4	0,002	748,0	662,0	0,002
Nach dem Salzbad etwa 7 Tagen	235,1	301,3	0,001	748,0	333,2	0,001
Nach 20 Tagen	251,3	46,8	0,102	145,5	109,3	0,003
Nach 70 Tagen	172,7	16,8	208,670	44,2	55,1	146,250
Nach 180 Tagen . . .	64,1	1,6	66,187	14,3	7,3	54,500

Diese Zunahme lag aber der Hauptsache nach in einer bloßen Anreicherung der Organismen im Bruch infolge Molkenaustrittes, was ja aus der fast ebenso raschen nur scheinbaren Vermehrung der langsam wüchsigen Propionsäurebakterien ersichtlich war. Das darauffolgende Brennen (etwa 30 Min. bei 54—58°) hatte im allgemeinen eine weitere Abnahme der gesamten Mikroflora zur Folge. Dies ist eine Bestätigung der Feststellungen von Demeter und Schmid (3), während Frazier und Mitarbeiter (5) diese Keimabnahme nur für Str. lactis nachweisen konnten. Die thermophilen Streptokokken hingegen erfuhren bei ihren Versuchen eine Zunahme. Das Ausmaß dieser „Pasteurisierwirkung" beim Brennen war aber aus den Zahlen nur abgeschwächt zu ersehen, denn in diesem Stadium der Fabrikation gibt der Bruch noch stark Molke ab, wodurch nicht nur die Trockensubstanz, sondern auch die Bakterien im Bruch rein mechanisch angereichert werden.

Nach der Bearbeitung des Bruches im Kessel kam dieser auf die Presse und hier erreichten die Milchsäurebakterien in ihrer Gesamtheit (die erst später auftretenden Streptobakterien u. a. ausgenommen) innerhalb von 12—24 Std. ihren Höchstwert. Die Propionsäurebakterien nahmen dagegen weiter ab, auch noch während des etwa 7 Tage langen Verweilens der Käse im Salzbad, stiegen erst wieder im Gärkeller an und erreichten nach etwa 70 Tagen ihren höchsten Stand. Zu diesem Zeitpunkt übertrafen sie die andauernd abnehmenden Milchsäurebakterien zahlenmäßig sehr stark, um auch weiterhin die Oberhand zu behalten. Immerhin werden aber in diesem Stadium die Lebensbedingungen für alle Mikroorganismen bereits ungünstiger und sowohl die Milchsäurebakterien als auch die Propionsäurebakterien nehmen bis zur Vollreife (d. h. bei den Versuchskäsen bis zu 6 Monaten) ständig ab.

Die Propionsäurebakterien beteiligten sich demnach an der Reifung des Emmentaler Käses in ganz anderer Art als die Milchsäurebakterien. Zufolge ihres langsamen Wachstums entwickeln sie sich erst spät in größerer Zahl. Die Fähigkeit, Laktate unter Kohlensäurebildung anzugreifen (Ursache der Lochbildung), ermöglicht ihnen, solange noch Laktate vorhanden sind, ein gutes Gedeihen. Das Ergebnis der Artbestimmung der isolierten Stämme muß einer späteren Mitteilung vorbehalten bleiben. Bisher wurden im Emmentaler Käse häufiger gefunden: P. technicum und P. pentosaceum [O. Jensen (13)], ferner P. Shermanii, P. Freudenreichii und P. rubrum [Staub (17)].

Obige Mitteilung, als vorläufige Bearbeitung größerer Versuchsergebnisse, läßt erneut die Notwendigkeit erkennen, bei Reifungsstudien die Bakterienflora genauer in den einzelnen Reifungsstadien zu erfassen. Nur auf diese Art kann für die verschiedenen Arten und Gruppen der Reifungsflora das Ausmaß und ihre Bedeutung für die Reifung erkannt werden, und erst damit kommen wir dem Ziele näher, vielleicht auch aus pasteurisierter Milch unter Verwendung der nötigen Reinkulturen befriedigende Ergebnisse in der Hartkäserei zu erreichen.

Zusammenfassung.

1) Um brauchbare Werte für die bakteriologische Untersuchung von Bruch und Käse zu erhalten, muß zur Herstellung einer feinen Suspension ein schonendes und doch genügend fein verteilendes Verfahren gewählt werden (Glasmörser nach Seifried).

2) Die Milchsäurebakterien, soweit sie einerseits nach 2 Tagen bei 45° und andererseits nach 4 Tagen bei 30° erfaßbar waren, verhielten sich bei der Reifung von Emmentaler Käsen recht ähnlich und gingen in ihrer Gesamtheit schon ab Salzbad zahlenmäßig zurück. Das zeitlich verschieden liegende Zahlenmaximum für die einzelnen Gruppen von Streptokokken und Langstäbchen ist aus der gegebenen summarischen Darstellung nicht ersichtlich.

3) Den Propionsäurebakterien, mit einem verbesserten Verfahren auf Petrischalen gezüchtet und gezählt, kommt erst nach 1—2 Monaten ein bedeutender Anteil an der Reifung zu.

Schrifttum.

1) Burri, Landw. Jb. Schweiz **29**, 624 (1915). — 2) Ders., u. Staub, Ebenda **29**, 626 (1915). — 3) Demeter u. Schmid, Milchw. Forschgn **17**, 244 (1935). — 4) Dorne, u. Thöni, Landw. Jb. Schweiz **50**, 859 (1936). — 5) Frazier, Sanders, Boyer a. Long, J. Bacter. **27**, 539 (1934). — 6) v. Freudenreich, Landw. Jb. Schweiz **9**, 100 (1895). — 7) Harrison, Society of Agric. Bact. (England) Abstr. of proc. S. 12—14, 1938. — 8) Kuntze, Zbl. Bakter. II **21**, 745 (1908). — 9) Manteufel, Zbl. Bakter. I Orig. **89**, 248 (1922). — 10) van Niel, The Propionic Acid Bacteria, Haarlem (Boissevain) 1928. — 11) Orla-Jensen, Landw. Jb. Schweiz **18**, 319 (1904). — 12) Ders., Ebenda **20**, 287, 320 u. 435 (1906). — 13) Ders. (Burri-Festschrift, S. 37—39) Schweiz. Milchztg (1937). — 14) Rodenkirchen, Milchw. Forschg **19**, 197 (1937). — 15) Seifried, Zbl. Bakter. I Orig. **127**, 383 (1933). — 16) Sherman, J. Bacter. **6**, 379 (1921). — 17) Staub (Burri-Festschrift, S. 86—90) Schweiz. Milchztg (1937).

25. M. Seelemann:

Vorkommen und biologisches Verhalten von tier- und menschenpathogenen Streptokokken in der Milch[1]).

Auf dem Gebiete der Differenzierung der Streptokokken ist trotz jahrzehntelanger Bemühungen zur Zeit noch manches ungeklärt.

Ich möchte mich heute nicht allgemein zu dem Thema „Typenlehre der Streptokokken“ äußern, so wie das Schottmüller, Lingelsheim, Wirth,

1) Aus dem Institut für Milchhygiene der Preußischen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft in Kiel (Direktor: Prof. Dr. Seelemann).

Die Untersuchungen wurden mit Mitteln durchgeführt, die das Reichsministerium für Ernährung und Landwirtschaft in dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt hatte.

Heim, Gundel und andere Humanmediziner getan haben; es soll gewissermaßen nur ein Ausschnitt aus dem gesamten Streptokokkengebiet behandelt werden, nämlich die Milch- bzw. Euterstreptokokken, wobei allerdings wegen der engen Zusammenhänge bestimmte Erkenntnisse der Humanmedizin mitzuberücksichtigen sind.

Auf dem Gebiete der Erforschung der tier- und menschenpathogenen Streptokokken, die irgendwie etwas mit dem Euter oder der Milch zu tun haben, ist durch die Arbeiten der letzten Jahre eine weitgehende Klärung hinsichtlich Trennung der Arten und ihrer einheitlichen Beurteilung herbeigeführt worden.

Naturgemäß ist die genaue Kenntnis der verschiedenen ganz gut voneinander unterscheidbaren Arten oder Typen noch längst nicht Allgemeingut sämtlicher Institute geworden, die sich mit Milchuntersuchungen und Mastitisdiagnose beschäftigen.

Zur Klärung der Milch- und Euterstreptokokken-Bakteriologie, soweit sie in diesem Rahmen Gegenstand der Erörterung sein soll, haben zahlreiche deutsche Arbeiten, wohl in erster Linie die von Klimmer und Haupt, Diernhofer, Rudolf, Seelemann und Hadenfeldt, beigetragen. Auch im Auslande, namentlich in Amerika, England, Dänemark, Norwegen, Schweden und Finnland, hat man sich mit diesen Streptokokken befaßt, wobei vor allem die Bedeutung der sog. hämolytischen Streptokokken für die Milchhygiene vielfach besonders hervorgehoben wird. Daneben ist noch eine große Zahl von Arbeiten herausgekommen, die teils ebenfalls zur Klärung beigetragen, teils aber auch Verwirrung angerichtet haben.

Das Studium der Milch- und Euterstreptokokken ist nicht nur für den Veterinär- und Milchbakteriologen von größtem Interesse, sondern es dürfte auch den Humanmediziner aus bestimmten hygienischen und epidemiologischen Gründen angehen. Kommen doch in der Milch und im Euter zuweilen Streptokokken vor, die auch schon aus krankhaften Prozessen beim Menschen isoliert, oder sogar als unmittelbare Ursache bestimmter Erkrankungen des Menschen (teils epidemischen Charakters) nachgewiesen worden sind. Ja, es dürften auch in der Milch bzw. dem Euter Streptokokken vorkommen, die mancher gesunde Mensch beherbergt.

Andere Streptokokkenarten rufen katarrhalische oder entzündliche Erscheinungen im Euter (Mastitiden) hervor, die zwar nicht unmittelbar eine pathogene Bedeutung für den Menschen haben, aber doch zu histologischen sowohl wie chemischen und physikalischen Veränderungen der Milch führen, wodurch dieses Lebensmittel mehr oder weniger stark in seinem Genußwert herabgesetzt, „bedingt tauglich", verdorben oder ekelerregend wird oder werden kann.

In seiner „Typenlehre der Streptokokken" hat Gundel 2 Kardinalsätze herausgestellt, die auch nach meinen Beobachtungen für die Milch- und Euterstreptokokken gelten und zur Erleichterung des Hindurchfindens durch die vielen Arten und Abarten sowie zur gegenseitigen Verständigung unbedingt aufrechterhalten werden müssen:

1. An der Konstanz der Arten muß festgehalten werden. Hiervon dürfen uns gewisse Abweichungen (gewissermaßen das „Aus-der-Rolle-Fallen") mancher sonst typischen Stämme in einzelnen morphologischen und biologischen Merkmalen nicht abbringen. Solche „Uebergänge" haben wir zweifellos vielfach in der Natur; sie sind wohl durch „äußere" Einflüsse (des Mediums oder des Standortes) bedingt.

2. Eine Typengliederung ist deswegen besonders dringend, weil die verschiedenen Euter- und Milchstreptokokken auch

verschiedene Wirkungen verursachen, und hiervon ihre wirtschaftliche, pathogene und hygienische Bedeutung wesentlich abhängt.

Eine Typengliederung der Streptokokken (einschließlich der Euter- und Milchstreptokokken) ist nach verschiedenen Gesichtspunkten und Merkmalen vorgenommen bzw. versucht worden; in der Hauptsache ist eine Einteilung in apathogene und pathogene oder in anhämolytische und hämolytische erfolgt. Gundel, der in seiner „Typenlehre“ im wesentlichen die menschenpathogenen Streptokokken berücksichtigt, unterscheidet 2 Hauptgruppen:

A. Stabile Stämme	B. Labile Stämme
I. Strept. pyogenes haemolyticus	I. Pleomorphe Streptokokken
II. „ viridans	1. Mund-
III. „ lanceolatus (Pneumokokken)	2. Darm-(Enterokokken)
IV. Obligat anaerobe Streptokokken	3. Milchstreptokokken
	II. Uebrige anhämolytische Streptokokken.

Bei der Behandlung meines Themas kann ich mir das vorstehende Schema nicht völlig zu eigen machen, da in der Milch bzw. dem Euter, wie noch gezeigt werden wird, sowohl der Gruppe A. I und III (Strept. pyogenes haemolyticus und lanceolatus) als auch der Gruppe B. I 3. nach Gundel zuzurechnende Stämme vorkommen.

Für den vorliegenden Fall erachte ich es für zweckmäßiger, die Untergruppe der „Milchstreptokokken“ in 2 besondere Untergruppen zu unterteilen:

I. Pathogene Euterstreptokokken.
II. Apathogene Milchstreptokokken.

Unter I. (Pathogene Euterstreptokokken) möchte ich diejenigen Arten verstanden wissen, die das Euter normalerweise nicht besiedeln, die jedoch, wenn sie in das Euter eindringen, hier auch zumeist gewisse pathologische Veränderungen im Gewebe oder solche der Milch verursachen: sog. Katarrhe oder Entzündungen. Sie sind also „rinderpathogen“; eine von diesen Arten kann auch „menschenpathogen“ wirken.

Mit den unter II. genannten (apathogenen) Milchstreptokokken bezeichnet man meines Erachtens zweckmäßig diejenigen Arten, die zuweilen auch im Euter vorkommen können, im allgemeinen aber nicht primär, sondern sekundär in die Milch gelangen und weder tier- noch menschenpathogen sind.

Auf hier und da zwischen den beiden Untergruppen I und II vorkommende bzw. mögliche Uebergänge werde ich noch bei Besprechung der Uebersicht hinweisen.

Die zu den beiden Untergruppen der Euter- und Milchstreptokokken gehörenden Arten lassen sich nach mehrfacher Erfahrung auf Grund einer mehr oder weniger großen Zahl namentlich biologischer Unterscheidungsmerkmale sehr gut voneinander trennen, d. h. wir können mit Hilfe dieser Merkmale, die auf einem ganz bestimmten Verhalten auf bestimmten Nährböden (bzw. Nährflüssigkeiten) sowie bei der Pathogenitätsprüfung beruhen, eine Reihe weitgehend konstanter Arten feststellen. Bei der Aufstellung einer möglichst klaren Uebersicht, um die ich mich an Hand der Arbeiten inländischer Autoren (Klimmer und Haupt, Rudolf, Diernhofer, Seelemann und Hadenfeldt) sowie namentlich amerikanischer und englischer Forscher (Brown, Sherman, Minett, Stableforth, Edwards und andere) bemüht habe, glaubte ich von den hier und da vorkommenden weniger bedeutenden Uebergangsformen absehen zu dürfen; ich habe vielmehr nur die am meisten vorkommenden Hauptvertreter aufgenommen.

In diesem Zusammenhange interessieren lediglich die Streptokokken der Untergruppe I (pathogene Euterstreptokokken — Mastitisstreptokokken) (siehe beiliegende Tabelle).

Da bei der Prüfung und Eingruppierung von Streptokokkenstämmen die Verwendung einheitlicher Nährböden zum Zwecke möglichst gleichmäßiger Beurteilung von größter Bedeutung ist, seien zunächst hier einige technische Bemerkungen vorausgeschickt:

Bemerkungen zur Herstellung einzelner Nährmedien.

Bouillonagar (Spalte 6): Gewöhnlicher Rindfleisch- oder besser noch Pferdefleischagar (2,5 Proz.) mit Zusatz von 1 Proz. Pepton, 0,5 Proz. Kochsalz, 0,2 Proz. Natrium-Phosphat, p_H etwa 7,4.

Bouillon (Spalte 7): Zusätze wie beim Agar. — Besondere Zusätze, wie Zucker oder Serum, sind nicht unbedingt erforderlich, verstärken das Wachstum jedoch etwas.

Lackmusmilch (Spalte 9): Gesunde frische Vollmilch mit Zusatz von 7 Proz. Lackmustinktur (Kahlbaum). 3mal im Dampftopf sterilisieren (Heim, Z. Hyg., Bd. 102, 1924).

Methylenblaumilch (Spalte 10): 1 ccm einer 0,5proz. wäßrigen Methylenblaulösung + 10 ccm sterile Vollmilch (Sherman u. Albus, J. Bacter., Vol. 3, 1918).

Gärnährböden (Spalte 11a—11h): Bei der Herstellung dieser Nährböden wird von einer mit Colibakterien entzuckerten Rindfleischbouillon ausgegangen. Nach 48stünd. Bebrütung der Colibakterien wird die Flüssigkeit sterilisiert und nach Zufügen von Kieselgur filtriert. Die nunmehr klar gewordene Nährflüssigkeit wird mit den üblichen Salz- und Peptonmengen versetzt, auf p_H 7,4 wieder eingestellt und alsdann erhitzt und nochmals filtriert. Zusatz von etwa 3proz. Lackmuslösung (Kubel-Thiemann), Abfüllen in Röhrchen zu 9 ccm und 2mal 30 Min. an 2 aufeinanderfolgenden Tagen im Dampftopf sterilisieren. Vor dem Beimpfen 1 ccm der gewünschten 10proz. Zuckerlösung, die vorher im Dampftopf erhitzt worden ist, zu der vorher sterilisierten Bouillon zufügen. Sterilitätsprüfung 24 Std. im Brutschrank.

Laktosebouillon (Spalte 12): Gewöhnliche Bouillon mit 1 Proz. Laktose. End-p_H bestimmt nach 10tägigem Aufenthalt im Brutschrank.

Aeskulinbouillon (Spalte 13): Diernhofer-Wien gibt für die Aeskulinbouillon folgende Herstellungsweise an (Milchw. Forschg, Bd. 13, S. 368, 1932). In gewöhnlicher Bouillon wird 0,1 Proz. Aeskulin-Merck aufgelöst. Diese Aeskulinbouillon unterscheidet sich äußerlich von gewöhnlicher Bouillon durch eine recht deutliche blaue Fluoreszenz. Die Spaltung des Aeskulins erkennt man schon grobsinnlich daran, daß die blaue Fluoreszenz verschwindet, und die Flüssigkeit etwas intensiver gelb oder gelbgrünlich wird. Ganz einwandfrei ist die Aeskulinspaltung erkennbar, wenn man zu der 24—48 Std. alten Kultur einige Tropfen (bis 0,5 ccm auf 10 ccm Bouillon) einer 1proz. wäßrigen Lösung von Ferrizitrat (Ferrum citricum oxydatum) zusetzt. Haben die Keime das Glykosid gespalten, so tritt sofort intensive Schwärzung der Bouillon ein; wurde Aeskulin nicht gespalten, bleibt die Bouillon hell. Der Vorteil der Aeskulinbouillon liegt darin, daß mit ihrer Hilfe einige wichtige Streptokokkenarten voneinander getrennt werden können (z. B. Strept. lactis und uberis vom Strept. agalactiae und dysagalactiae sowie Strept. pyogenes haemolyticus).

Natriumhippuratbrühe (Spalte 14): Die Hippuratbrühe (Ayers und Rupp, J. inf. Dis., Vol. 30, 1922) wird nach den Angaben in der Arbeit von Klimmer und Haupt (Zbl. Bakter. I Orig., Bd. 126, 1927) in folgender Weise hergestellt:

Pepton	10 g
Kalziumchlorid	0,03 g
Natriumhippurat	10 g
1proz. Eisenchloridlösung . . .	1 Tropfen
dest. Wasser	1000 ccm
Natronlauge bis zu pH 7,1.	

Manche Streptokokkenstämme (Strept. agalactiae und uberis) haben die Eigenschaft, Hippursäure zu spalten; es wird dabei Benzoesäure und Glykokoll gebildet. Nach Ayers und Rupp kann man die Prüfung auf Benzoesäure unmittelbar in der 48stünd. Kultur mit 0,5 ccm einer 7proz. Eisenchloridlösung (auf 2 ccm Kultur) vornehmen. — Die Reaktion klappt nach unseren Erfahrungen ausgezeichnet.

Blutagar-Oberflächenkolonien (Spalte 15): Für die Beurteilung verschiedener Streptokokkenarten auf Blutagar ist es wichtig, daß immer die gleiche Herstellungsweise des Nährbodens erfolgt. Gewöhnlicher Fleischwasseragar mit 1 Proz. Pepton, dem nach Verflüssigung 5 Proz. steril entnommenes defibriniertes Blut vom Schaf, Rind oder Pferd zugefügt wird. Das Material wird auf diesen Platten mit Hilfe einer Platinöse ausgestrichen oder mit einem Drigalskispatel gleichmäßig auf der Platte verteilt. (Auf die je nach Verwendung dieser oder jener Blutsorte beobachteten Unterschiede ist unter Erläuterung Nr. 13 näher eingegangen.)

Brownscher Pferdeblutagar (Spalte 16): Die Herstellung dieses Pferdeblutagars erfolgt in der Weise, daß in einem Röhrchen mit 12 ccm verflüssigten und auf etwa 50° abgekühlten Agar, dem auf 1000 ccm Fleischwasser 0,5 g Glukose zugesetzt ist, 0,6 ccm Pferdeblut gegeben wird. Es erfolgt dann sofort die Beimpfung mit dem Streptokokkenmaterial und Ausgießen in Petrischalen.

Hämolysinversuch (Spalte 17): Die Probe auf Hämolysin macht man in der nach Brown, Frost und Shaw angegebenen Weise: Zu 0,5 ccm Bouillonkultur fügt man 0,5 ccm einer 5proz. Aufschwemmung von Kaninchenerythrozyten bei 37° C; wenn in 2 Std. keine oder nur geringe Hämolyse erfolgt, so können weitere Proben unterlassen werden: kein Streptococcus epidemicus (vgl. auch Seelemann und Hadenfeldt, Zbl. Bakter. I Orig., Bd. 126, S. 231, 1932).

Galleblutagar (Spalte 18): Der Galleblutagar wird nach den Angaben von Belenky und Popowa (Zbl. Bakter. I Orig., Bd. 113, S. 22, 1929) hergestellt, indem man zu 3proz. Pferdefleischagar zunächst 5 Proz. defibriniertes Hammelblut und 10 bzw. 40 Proz. sterile Rindergalle hinzufügt.

Erläuterungen zu den einzelnen Merkmalen der Uebersicht [1]).

Zu 1: Bei dem Strept. agalactiae handelt es sich um den Erreger des sog. echten gelben Galtes, der bereits vor rund 100 Jahren (etwa in den vierziger Jahren des 19. Jahrhunderts) namentlich von Schweizer Tierärzten in größerem Umfange in Milchviehbeständen beobachtet worden ist. Als Entdecker des Streptokokkus kommen die beiden französischen Forscher

1) Die Erläuterungen beziehen sich auf die schrägen eingeklammerten ( ) Zahlen in den verschiedenen Feldern der Uebersicht.

Nocard und Mollereau (Arch. vet. 561, 1884) in Frage. Diese Streptokokkenart ist späterhin immer wieder bei katarrhalischen Mastitiden (Zysternen- und Euterkatarrhen) in allen Milchwirtschaft treibenden Ländern festgestellt worden; in Deutschland haben sich insbesondere mit der Erforschung dieses Erregers Kitt (München), Ernst (München), Klimmer und Haupt (Leipzig), Diernhofer und Rudolf (Wien) und Seelemann (Kiel) befaßt. Der Streptococcus agalactiae ist heute derjenige Keim, der am häufigsten zu Katarrhen und Sekretionsstörungen der Milchdrüse Veranlassung gibt. Die wirtschaftliche Bedeutung dieses Leidens ist sehr groß.

Zu 2: Der Strept. agalactiae ist bisher nur im Euter (und zwar in der Regel in mehr oder weniger stark veränderten Sekreten) nachgewiesen worden. Alle Bemühungen (auch eigene Versuche), ihn aus verschiedenem, im Kuhstall entnommenem Material zu isolieren, sind fehlgeschlagen; niemals konnten aus solchem aus der Außenwelt stammenden Material Streptokokken mit den charakteristischen biologischen Merkmalen des Agalactiaetyps nachgewiesen werden. Im Schrifttum, namentlich in der älteren Literatur, sind zwar vereinzelt Angaben vorhanden, wonach der Nachweis des Agalactiaetyps im Material der Außenwelt gelungen sein soll. Vermutlich hat es sich hierbei aber doch nicht um den echten Streptococcus agalactiae gehandelt.

Zu 3: Nach eigenen Untersuchungen (vgl. Seelemann, Die Streptokokkeninfektionen des Euters usw., Verlag M. u. H. Schaper, Hannover, 1932) setzt die Agalactiaeinfektion in der Regel latent, d. h. ohne merkliche Erscheinungen (für den Melker oder den Besitzer) ein. Untersucht man „frisch infizierte" Euter klinisch, wozu wir in zahlreichen Fällen im Rahmen laufender Prüfungen von Einzel- und Viertelsgemelksproben in galtverseuchten Beständen Gelegenheit hatten, so kann man bei diesen Infektionen schon innerhalb weniger Wochen gewisse Gewebsveränderungen ganz deutlich feststellen: Die betr. frisch infizierten Euterviertel sind etwas „voller", im ausgemolkenen Zustande fühlen sie sich meist etwas derber an („knotig", „strängig"); sie sind auf jeden Fall beim Palpieren nicht so weich wie die nichtinfizierten Euterviertel. Nicht selten läßt sich auch beim Melken feststellen, daß aus dem infizierten Euterviertel die Milch etwas schwerer herauszuziehen ist; es verbleibt daher häufig ein Rest Milch in den betr. Eutervierteln. Auf Grund zahlreicher Untersuchungen an erst kürzlich neuinfizierten Eutervierteln bin ich der Ansicht, daß diese im allgemeinen kein völlig normal zusammengesetztes Sekret mehr liefern. Die Milch aus derartigen Eutervierteln ist fast stets geringgradig verändert; sie weist mindestens etwas erhöhten Zellgehalt, dementsprechend auch eine erhöhte Katalase und veränderte Reaktion sowie eine Erhöhung des Chlorgehaltes usw. auf. Durch sorgfältiges Ausmelken (was aber ja in der Praxis leider gewöhnlich nicht erfolgt) lassen sich alle leichten Veränderungen teilweise beseitigen; allerdings gelingt es ohne besondere Behandlung solcher Viertel mit bestimmten Akridinfarbstoffen (Infusionstherapie) in der Regel nicht, auch die Streptokokkenbesiedlung restlos zu beseitigen. Sogenannte „akute Anfälle" kommen zuweilen vor, wenn die Pflege des Euters und das Melken besonders schlecht sind, oder wenn besondere disponierende Momente noch außerdem hinzukommen. Alle diese Fälle gehen aber in ein sog. chronisches Stadium, welches dann sehr häufig zu einem bleibenden Milchrückgang auf den betr. infizierten Vierteln führt, über (chronischer Verlauf des gelben Galtes vielfach über mehrere Laktationsperioden hindurch mit oder ohne vollständiges Ergalten).

Zu 4: Im Eutersekret sind längst nicht immer die sog. typischen langen Ketten nachweisbar; meistens lassen sich sogar bloß kurze bis mittellange

Ketten finden. In stärker veränderter Milch weisen die Ketten nicht selten Degenerationsformen auf („Schatten", etwas geblähte Formen, Staketformen, die sich nur schwach oder unterbrochen färben lassen). Zuweilen kann man auch sog. „Stäbchenformen" finden, die aber z. B. in Bouillon wieder als Kokken wachsen.

Zu 5: Die Kolonien der Galtstreptokokken auf Agarplatten sind nicht einheitlich, wenn auch ihre Grundform bis zu einem gewissen Grade charakteristisch ist (Betrachtung mit dem schwachen Trockensystem). Die Kolonien sind verhältnismäßig hell und durchscheinend, der Rand ist immer etwas gezackt, oftmals weist die Peripherie mehr oder weniger lange „Ausläufer" auf. Auf feuchten Agarplatten bildet sich zuweilen ein förmlicher „Kettenrasen" aus. Eine Reihe von charakteristischen Wuchsformen ist in einer Arbeit von Seelemann aus dem Jahre 1928 (Arch. Tierheilk., Bd. 58, S. 1) in anschaulicher Weise abgebildet. Wenn diese Kolonieformen auf den ersten Blick auch ganz deutliche Strukturunterschiede aufweisen, so müssen sie auf Grund ihres biologischen Verhaltens doch alle dem gleichen Typ zugerechnet werden (vgl. hierzu die übrigen einheitlichen Merkmale).

Zu 6: Die charakteristische Wuchsform (schleimig-flockiges Wachstum in Bouillon) ist schon von Nocard und Mollereau beobachtet worden. Das Wachstum tritt sehr schnell ein; bereits nach etwa 12 Std. beginnen sich kleine Flöckchen zu bilden, die meist der Wandung des Kulturröhrchens ansitzen, dann aber zu immer größeren Flocken sich zusammenballen und schließlich auf den Boden des Reagenzglases fallen. Gewöhnlich ist nach 24stünd. Wachstum bei 37° C die überstehende Nährflüssigkeit völlig klar. — (Nach einigen vergleichenden Prüfungen dürfte der von Heim beschrieben Streptococcus longissimus in Bouillon ein dem Galtstreptokokkus sehr ähnliches Wachstum zeigen. Im übrigen weicht er aber weitgehend ab.)

Zu 7: Die Gramfärbung ergibt lange Ketten, die häufig in gewundenen und (nicht allzu dicht) verschlungenen Knäueln zusammenliegen. Die einzelnen Glieder erscheinen verhältnismäßig groß, so wie man sie selten bei anderen Streptokokkenarten findet. In älteren Kulturen nehmen die Streptokokken oft eigentümliche Formen an, so daß sie sehr an Diphtheriebakterien erinnern, worauf u. a. auch Diernhofer hingewiesen hat (Arch. Tierheilk., Bd. 61, 1930). Der Streptokokkus ist m. E. einer der gramfestesten.

Zu 8: Bei einem Teil der Stämme läßt sich eine feine Streifenbildung durch die Wand des Reagenzglases erkennen.

Zu 9: Bei schwacher Beimpfung der Methylenblaumilch (z. B. eine Oese Kultur auf etwa 10 ccm Methylenblaumilch) tritt keine Veränderung des Nährbodens ein, weil der Strept. agalactiae durch die Methylenblaukonzentration (1:20000) gehemmt wird; es tritt überhaupt keine Vermehrung der Streptokokken ein. Daher kann es auch zu keiner Veränderung der Milch kommen. Beimpft man jedoch die Methylenblaumilch mit wesentlich stärkeren Mengen, so vermehren sich die Streptokokken sehr wohl, wodurch eine Reduktion oder teilweise Reduktion des Methylenblaufarbstoffes mit Gerinnung bewirkt wird.

Zu 10: Die Prüfung der Vergärung von Raffinosebouillon für die Typendifferenzierung der Streptokokken hat keine allzu große Bedeutung, weil die tier- und menschenpathogenen Kokken im allgemeinen die Raffinose ebensowenig angreifen wie auch manche Stämme des Strept. lactis. Nach einer Angabe von Sherman (Bacter. Reviews, Dez. 1937) greift der Strept. lactis die Raffinose nicht an, jedoch sollen gelegentlich Abweichungen hiervon vorkommen.

Zu 11: Die größere Zahl der Agalactiae-Stämme dürfte Salizin angreifen; es gibt aber auch Stämme, die es nicht vergären.

Zu 12: Der Strept. agalactiae dürfte hier in der Mitte zwischen dem Strept. lactis und dem Strept. pyogenes haemolyticus stehen. Der Strept. lactis säuert durchschnittlich etwas schneller und kräftiger als der Strept. agalactiae; am wenigsten der Strept. pyogenes haemolyticus.

Zu 13: Wir bevorzugen die Beobachtung von Oberflächenkolonien auf Blutagar. In der Hauptsache lassen sich, gleichgültig, welche Blutarten man verwendet, zwei verschiedene Wuchsformen bei den Galtstreptokokken beobachten: 1. Sehr viele Galtstämme lassen den Blutnährboden unverändert (k. H. = keine Hämolyse). 2. Nicht selten kann aber auch festgestellt werden, daß Galtstämme eine schwache Hämolyse (s. H.) verursachen. Der hämolytische Hof ist sehr schmal; auch sind in dieser schmalen Zone die Blutkörperchen noch als korpuskuläre Elemente nachweisbar. Bei ganz dünn gegossenen Blutplatten kann allerdings der schmale hämolytische Hof fast durchsichtig sein. Diese schwache Form der Hämolyse ist nicht zu verwechseln mit der sog. vollständigen Hämolyse (β-Hämolyse der Amerikaner und Engländer), bei der die hämolytische Zone um die Kolonien (wie z. B. beim Pyogenestyp) sehr viel breiter (bis zu mehreren Millimetern) und vollständig durchsichtig ist (= v. H.). In ihr sind auch die Erythrozyten vollständig aufgelöst. Bei einem kleinen Teil der Stämme dürfte auch — als 3. Wuchsform — eine Vergrünung vorkommen. Es muß nun noch bemerkt werden, daß diese hämolytischen Erscheinungen sehr wechselnd sind. So läßt sich z. B. beobachten, daß ein Stamm beim Ausstreichen auf eine Blutplatte sowohl Kolonien ohne jegliche Veränderung des Blutnährbodens als auch Kolonien mit schwacher Hämolyse zeigt. Impft man dann eine Kolonie ohne hämolytischen Hof in Bouillon und dann erneut wieder auf Blutplatten über, so läßt sich dasselbe Bild wiederum beobachten. Andere Stämme dagegen scheinen stets ohne Hämolyse zu wachsen und andere wiederum stets mit dem schwachen hämolytischen Hof. Diese Erscheinungen wechseln auch je nach der Blutsorte (Schaf, Rind oder Pferd) und treten hier auch wiederum unterschiedlich auf. Es besteht also in dieser Beziehung überhaupt keine Einheitlichkeit. Aus allen diesen Gründen halten wir die Prüfung des Verhaltens von Streptokokkenstämmen auf Blutplatten nur aus dem Grunde für wichtig, um die nicht hämolytischen oder schwach hämolytischen (Agalactiaetyp) von den stark hämolytischen (Pyogenes-, Epidemikustyp) Stämmen unterscheiden zu können. Nach eigenen Beobachtungen und den Angaben anderer bekannter deutscher Galtforscher dürfte der echte Strept. agalactiae niemals diese vollständige Hämolyse verursachen.

Zu 14: Bei diesem Tiefenkolonienwachstum gibt es ähnliche Wuchsformen wie auch auf der Oberflächenblutplatte. Brown bezeichnet sie mit griechischen Buchstaben; er unterscheidet

Typ α (= viridans),
Typ β (= haemolyticus),
Typ γ (= anhaemolyticus).

Die charakteristische Form der α-Hämolyse ist folgende: Nach 24 Std. Bebrütung bei 37° C sind die Tiefenkolonien von einer schmalen Zone etwas grünlich verfärbter Blutkörperchen umgeben. Eine Hämolyse kann bei einzelnen Kolonien angedeutet sein. Nach weiteren 24 Std. bei 37° C ist das Bild unverändert, nur sind die Kolonien etwas größer geworden. Wird nun die Platte in den Eisschrank gebracht, so erfolgt innerhalb eines Tages die Bildung

eines deutlich hämolytischen Saumes um die Kolonie. Bei erneutem Einstellen in den Brutschrank kann sich nach 24 Std. wiederum um den hämolytischen Hof eine neue grüne Zone bilden; stellt man die Platte nochmals in den Eisschrank, so kann sich wieder der hämolytische Hof bilden usf. Es kommen auf diese Weise unter Umständen mehrere vergrünende Zonen und mehrere hämolytische Höfe (Ringe) zustande.

Natürlich gibt es auch Uebergänge, so vom α- zum β-Typus, der von Brown als α I bezeichnet wird. Hierbei soll die hämolytische Zone nicht so vollkommen blank erscheinen, wie dies beim β-Typus der Fall ist (der als identisch mit der vollständigen Hämolyse nach Schottmüller anzusehen ist). Bei dem α I-Typus lassen sich bei der mikroskopischen Betrachtung in der aufgehellten Zone immer noch ungelöste Erythrozyten erkennen.

Der γ-Typus zeichnet sich durch vollkommenen Mangel eines hämolytischen Vermögens aus. In der Arbeit von Klimmer und Haupt (Ergebnisse der Hygiene, Bakteriologie, Immunitätsforschung und experimentellen Therapie, Verlag Jul. Springer, Berlin 1930) wird folgende Erklärung für die α- bzw. α I-Hämolyse gegeben: Die Streptokokkenkolonien bilden Säure und Wasserstoffsuperoxyd, durch deren Zusammenwirken bei 37° C Bleichung und Fixierung der Erythrozyten erfolgt und das Hämoglobin in ein dem Methämoglobin nahestehendes grünliches Abbauprodukt verwandelt wird. Nach Unterbrechung der Wasserstoffsuperoxydbildung (bei niederer Temperatur) und nach Verflüchtigung des gebildeten Wasserstoffsuperoxyds dif fundiert die Säure über die fixierten roten Blutkörperchen hinaus in den Agar mit frischen Blutkörperchen und löst diese auf.

Die Angaben über das Verhalten des Strept. agalactiae in diesem Blutagar sind in der in- und ausländischen Literatur nicht ganz einheitlich, zum Teil dürften sogar Verwechslungen vorgekommen sein. Manche Autoren haben gewisse Streptokokkenstämme als „schwach β-hämolytisch“ bezeichnet; möglicherweise sind dies aber α I-hämolytische nach Brown gewesen. Klimmer und Haupt geben an, daß der Strept. agalactiae vorwiegend nach dem Typus α wächst, selten nach dem Typus α I, verhältnismäßig häufig nach dem Typus γ, niemals jedoch nach dem β-Typus. Auch nach eigenen Erfahrungen wächst der Galtstreptokokkus niemals nach dem β-Typus; er macht auch niemals die vollständige Hämolyse wie der Strept. haemolyticus Schottmüller und mit diesem identische Arten. Auffällig ist nur, daß in amerikanischen Arbeiten häufig von dem Antreffen des β-Typs in der Milch die Rede ist, in Deutschland jedoch der β-Typ nur ausnahmsweise in der Milch festgestellt worden ist.

Auch eine Veröffentlichung von Bendixen (Vortrag auf dem XIII. Internat. tierärztl. Kongreß in Zürich/Interlaken 1938) läßt erkennen, daß manche Unklarheiten hinsichtlich des Vorkommens „hämolytischer“ Streptokokken in der Milch und der Eingruppierung von Mastitis-Streptokokkenstämmen auf Grund ihres Verhaltens in Blutagar (Tiefenkolonien) bestehen.

Schließlich soll es noch einen γ G-Typus geben, der keine Hämolyse hervorruft, aber grün wächst. Ich möchte hier noch einmal wiederholen, daß es m. E. zweckmäßiger ist, bei der alten Schottmüllerschen Beurteilung nach dem Oberflächenwachstum zu bleiben. Fest steht, daß hier viele Agalactiae-Stämme keine Veränderung des 5proz. Blutnährbodens bewirken, und daß anderseits auch ziemlich viele Agalactiae-Stämme eine schwache Hämolyse (siehe unter Erläuterung 13) verursachen. Eine besondere epidemiologische Bedeutung kommt jedoch diesem Verhalten nicht zu. Wesentlich ist vielmehr die Unterscheidung von denjenigen Streptokokkentypen, die auf der Blutplatte eine sog. vollständige

Hämolyse hervorzurufen vermögen, weil es sich bei derartigen Stämmen um solche von pathogener Bedeutung für den Menschen handeln kann (siehe unter Erläuterung 26).

Zu 15: Im allgemeinen wird im Schrifttum angegeben, daß, wie auch eigene Prüfungen ergeben haben, der Strept. agalactiae für kleine Versuchstiere nicht pathogen ist. Vereinzelt sollen Stämme vorkommen, die z. B. Mäuse nach intraperitonealer Impfung töten können. Wie hoch dieser Prozentsatz ist, könnte nur durch eine planmäßige Prüfung sämtlicher anfallenden Stämme an kleinen Versuchstieren geklärt werden.

Zu 16: Nach den Erfahrungen der letzten 10—15 Jahre kann die Tatsache als feststehend gelten, daß die durch den Strept. agalactiae hervorgerufenen katarrhalischen Mastitiden eine unmittelbare gesundheitsschädliche Bedeutung für den Menschen nicht besitzen. Auch von mir in Kiel durchgeführte Fütterungsversuche mit Galtmilch an Ferkeln und Kälbern haben ihre Harmlosigkeit für das Jungvieh erwiesen. Die in der älteren Literatur hier und da zu findenden Angaben über die Gefährlichkeit der „Streptokokkenmilch“ für den Menschen können nicht als beweisend angesehen werden, da sie keine genauen Unterlagen beibringen. Die sog. Galtmilch besitzt nur insofern eine hygienische Bedeutung, als ihre veränderte chemische und physikalische Zusammensetzung die Qualität der Milch mehr oder weniger stark beeinträchtigt, und das meist durch eine Leukozytenvermehrung oder einen Eitergehalt sich auszeichnende Sekret von Rechtswegen nicht als voll tauglich zum Genuß für den Menschen bezeichnet werden kann.

Zu 17: Diese früher nicht völlig geklärte Form des Strept. agalactiae, die möglicherweise mit den schon von Kitt und Ernst beschriebenen Strept. brevis identisch ist, haben wir bei Untersuchungen in schleswig-holsteinischen Galtbeständen sehr häufig als Ursache von Sekretionsstörungen des Euters und katarrhalischen Mastitiden feststellen können. Sie unterscheidet sich eigentlich nur durch ihr Verhalten in Bouillon von dem typischen Strept. agalactiae, die vorwiegend getrübt wird. Im mikroskopischen Ausstrich sind dann naturgemäß Diplokokken und kurze Ketten zu sehen. Dieser durch atypische Galtstreptokokken hervorgerufene Euterkatarrh kommt nach meinen Erfahrungen in zahlreichen Milchviehbeständen Schleswig-Holsteins vor, oftmals überwiegt bei den Infektionen diese Streptokokkenform sogar die typische (Seelemann, Die Streptokokkeninfektionen des Euters usw. Verlag M. u. H. Schaper, Hannover, 1932). Auch während des letzten Maul- und Klauenseucheganges 1937/39 konnte diese Form bei zahlreichen im Gefolge der Seuche auftretenden Neuinfektionen des Euters festgestellt werden (sogar fast ausschließlich). Sie ist übrigens schon vor Jahren auch von Krage und Gipmann (Arch. Tierheilk., Bd. 63, 1931) sowie von Kalweit (Inaug.-Dissertation Hannover, 1933) in Ostpreußen gefunden und näher beschrieben worden.

Zu 18: Der Strept. dysagalactiae ist bisher nur sehr selten beschrieben worden, und zwar von englischen Autoren; einige Male hat ihn auch Diernhofer bei Mastitiden des Rindes gefunden. Nach eigenen Erfahrungen kommt er ziemlich selten neben anderen Streptokokkeninfektionen in Galtbeständen vor. Er kann auf Grund seines biologischen Verhaltens nicht mit einem der anderen Mastitis verursachenden Streptokokken verwechselt werden. Schon durch sein Wachstum in Lackmusmilch unterscheidet er sich vom echten Galtstreptokokkus. In Sorbitbouillon soll er Säure bilden. Einige vom Institut aus Milchproben von galtverdächtigen Kühen isolierte Stämme (Sekrete verändert) verhielten sich so wie in der Uebersicht angegeben; einige andere

Stämme sowie auch einige von Diernhofer uns übersandte griffen Sorbit nicht an.

Zu 19: Nach eigenen Beobachtungen kann der Strept. dysagalactiae in vereinzelten Fällen in galtverseuchten Beständen, in denen sonst typische und atypische Agalactiaeformen vorkommen, Sekretionsstörungen bzw. Euterkatarrhe verursachen.

Zu 20: Der Strept. dysagalactiae ist sehr gut und schnell vom Strept. agalactiae (typische sowohl wie atypische Form) zu unterscheiden, und zwar durch die fehlende Gerinnung in Lackmusmilch und die Reduktion.

Zu 21: Die von uns geprüften Dysagalactiae-Stämme machten in der Methylenblaumilch teils schon nach 48 Std. Reduktion und Gerinnung, teils erst nach 4—8 Tagen.

Zu 22: Der Strept. dysagalactiae spaltet Natriumhippurat im Gegensatz zu den beiden Agalactiae-Typen nicht.

Zu 23: Das Verhalten auf Blutagar ist ähnlich wie bei den Agalactiae-Kolonien: in der Mehrzahl der Fälle keine Hämolyse, einzelne Stämme schwache Hämolyse.

Zu 24: Der Strept. uberis ist bisher ebenfalls weniger beachtet worden; er wurde von uns in Galtbeständen neben den typischen und atypischen Agalactiae-Formen verschiedentlich mit angetroffen.

Zu 25: Der Strept. uberis wächst in Lackmusmilch bei 37° ähnlich wie Strept. pyogenes haemolyticus; er spaltet aber Natriumhippurat, was der hämolytische Streptokokkus nicht vermag.

Mannit säuert er ebenfalls (wie viele Laktisstämme), was die Stämme des Strept. pyogenes haemolyticus im allgemeinen nicht tun. Außerdem unterscheidet er sich von diesen durch sein Verhalten auf der Blutplatte, auf der er nur schwache oder gar keine Hämolyse bewirkt.

Zu 26: Der Strept. pyogenes, der wohl als identisch mit dem Erysipel-Streptokokkus anzusprechen ist, spielt als Erreger von Mastitiden des Rindes nach den bisherigen Erfahrungen in Deutschland eine untergeordnete Rolle, weil er nämlich sehr selten vorkommt. Zum erstenmal ist er von Seelemann im Jahre 1930 bei Mastitiden des Rindes in Schleswig-Holstein festgestellt worden. Bezüglich Einzelheiten in klinischer, bakteriologischer und epidemiologischer Hinsicht sei auf die verschiedenen Veröffentlichungen von Seelemann und Hadenfeldt verwiesen (Zbl. Bakter. I Orig., Bd. 118, 1930 — Dtsch. tierärztl. Wschr. 1930, Nr. 23 — Zbl. Bakter. I Orig., Bd. 126, 1932 — Dtsch. tierärztl. Wschr. 1933, Nr. 34 — Z. Fleisch- u. Milchhyg., Bd. 44, 1933), die in den folgenden Jahren wiederholt diese Streptokokkenart bei Euterentzündungen beobachtet haben (insgesamt etwa 2 Dutzend Fälle von 1930—38).

Es ist die Frage erörtert worden, ob dieser in Deutschland bei Mastitiden festgestellte hämolytische Streptokokkus als identisch mit dem Strept. epidemicus der Amerikaner (Davis) anzusprechen ist. Bekanntlich sind hämolytische Streptokokken besonders in Amerika häufiger als Ursache kleinerer und größerer Epidemien nach Milchgenuß festgestellt worden (Angina, „sore throat“, „septic sore troath“). Es kann heute nicht mehr bestritten werden, daß in einzelnen Fällen die Epidemiologie dieser Erkrankungen als geklärt anzusehen ist. Danach muß man annehmen, daß von einem oder mehreren streptokokkenkranken Eutern größere Mengen Milch infiziert worden sind, nach deren Genuß anschließend ein mehr oder weniger großer Verbraucherkreis an den oben genannten Halsentzündungen (teilweise mit gefährlichen Komplikationen und Todesfällen) erkrankte.

Als Erreger ist dann mehrfach die gleiche Streptokokkenart sowohl bei der Kuh (Mastitis) als auch bei den Patienten (Milchverbraucher) ermittelt worden. In Amerika hat man ihr im allgemeinen die Bezeichnung Strept. epidemicus gegeben. Dieser soll sich durch Kapselbildung auszeichnen. In Amerika sind aber auch hämolytische Streptokokken in der Milch festgestellt worden, bei denen eine solche Kapsel nicht nachweisbar war.

In Deutschland konnten bisher irgendwelche Beziehungen zwischen den von Seelemann und Hadenfeldt und einigen anderen Forschern beobachteten Pyogenes-Mastitiden des Rindes und menschlichen Erkrankungen nicht nachgewiesen werden, obwohl es gelungen ist, z. B. in Halsabstrichen von Melkern Streptokokken nachzuweisen, die in ihren biologischen Merkmalen völlig mit denen aus Rindermastitis (und auch aus Uteri einiger notgeschlachteter Rinder) isolierten übereinstimmten.

Die Kapselbildung, welche zum Teil an den in Deutschland von Seelemann und Hadenfeldt aus Mastitissekret isolierten hämolytischen Streptokokken ebenfalls festgestellt worden ist, kann nach den Untersuchungen der genannten Autoren nicht als so charakteristisch und konstant für den Strept. epidemicus angesprochen werden, da sie allem Anschein nach ein ziemlich unsicheres Merkmal ist. So ließ sie sich an den deutschen Stämmen nur einige Male an frisch gezüchteten Blutplattenkulturen oder in aus dem Mastitissekret angefertigten Ausstrichen (Tuscheverfahren) nachweisen, in späteren Generationen jedoch nicht mehr. Dasselbe war auch nicht möglich nachzuweisen an alten Stämmen, die dem Verfasser aus Amerika unter der Bezeichnung „Strept. epidemicus" übermittelt worden waren.

Von amerikanischen und englischen Versuchsanstellern sowie von Bendixen-Kopenhagen ist darauf hingewiesen worden, daß angeblich nur die Pyogenes-Streptokokkenstämme „tierischer" Herkunft Sorbit vergären sollen. In dem zuletzt von Seelemann und Hadenfeldt beschriebenen Falle von Pyogenes-Mastitis (Z. Fleisch- u. Milchhyg., Bd. 44, 1933) konnte ein sorbitpositiver Stamm nachgewiesen werden, während interessanterweise ein aus einer völlig gesunden Viertelsgemelksprobe isolierter hämolytischer Streptokokkenstamm mit den Eigenschaften des Pyogenestyps Sorbit nicht vergärte (also demnach menschlicher Herkunft hätte sein müssen).

Es ist wohl angebracht, diese Fragen noch durch eingehende Bearbeitung künftig auftretender Pyogenes-Mastitiden genauer zu klären.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß Milch sowohl primär — also vom Rindereuter her (Mastitis) — als auch sicherlich sekundär — d. h. von Menschen, die an Halsentzündungen leiden oder hämolytische Streptokokken z. B. im Halse (Speichel) enthalten — mit hämolytischen Streptokokken infiziert werden kann. Auffallend bleibt es nur, daß in verschiedenen Ländern so viel Aufsehen von hämolytischen Streptokokkenbefunden in der Milch gemacht wird, während dies in Deutschland nicht der Fall ist und Epidemien dieser Art nicht beobachtet worden sind.

Zu 27: In den von Seelemann und Hadenfeldt beobachteten Fällen zeichneten sich die Pyogenes-Mastitiden durch einen akuten Verlauf (mit zum Teil septischen Erscheinungen) aus. Die Mastitiden können in eine chronische Form übergehen.

Zu 28: Die sog. humanpathogenen Pyogenesstämme sollen Trehalose angreifen, die tierpathogenen dagegen nicht.

Zu 29: Die Hämolyse war in allen Fällen kräftig (vollständig — im Gegensatz zum Agalactiaetyp).

Zu 30: Der Strept. infrequens und anginosus dürften Abarten des Strept. pyogenes haemolyticus bzw. epidemicus mit geringgradigen biologischen Abweichungen sein. Sie sind in Deutschland weder bekannt noch beschrieben worden.

Zu 31: Der Strept. lanceolatus (Strept. lanceolatus Gamaleia, Diplococcus lanceolatus Fränkel) ist bisher nur einmal von Roots und Karlson, Dorpat (Arch. Tierheilk., Bd. 63, 1931) beschrieben worden. Er verursachte bei einer Kuh eine akute Mastitis mit anschließender Septikämie und letalem Ausgang. Die genaue Prüfung des Stammes ergab einwandfreie Merkmale für den echten Diplococcus lanceolatus. Wir haben ihn bisher als Erreger von Mastitiden nicht beobachten können.

Zu 32: Nach den Angaben im Lehmann-Neumann (Bakteriologie, insbesondere bakteriologische Diagnostik, 2. Band Allgemeine und spezielle Bakteriologie, 7. Auflage, Verlag Lehmann, München, 1927) verursacht er im allgemeinen wohl nur schwache Säurebildung aus Zuckern.

Zu 33: Der Strept. lanceolatus verursacht im Gegensatz zum Strept. pyogenes haemolyticus nur eine schwache Hämolyse.

Zu 34: Nach den Beobachtungen von Rudolf und Diernhofer und eigenen Feststellungen dürfte auch der Strept. lactis, der sonst gewöhnlich als nützlicher Milchsaprophyt anzusprechen ist, imstande sein, unter gewissen Bedingungen in der Milchdrüse zu Sekretionsstörungen zu führen, ohne dabei seine charakteristischen biologischen Merkmale zu verlieren.

Zusammenfassung.

Auf dem Gebiete der tier- und menschenpathogenen Streptokokken, die irgendwie etwas mit dem Euter oder der Milch zu tun haben, ist durch die Arbeiten der letzten Jahre eine weitgehende Klärung hinsichtlich Trennung der Arten herbeigeführt worden.

Es wird vorgeschlagen, die große Gruppe der gewöhnlich als „Milch“-Streptokokken (Gundel) bezeichneten Arten in 2 besondere Untergruppen zu unterteilen: I. Pathogene Euterstreptokokken, II. Apathogene Milchstreptokokken.

Zu den pathogenen Euterstreptokokken rechnet man zweckmäßig diejenigen, die das Euter gewöhnlich normalerweise nicht besiedeln, die jedoch, wenn sie in das Euter eindringen, hier auch zumeist bestimmte pathologische Veränderungen im Gewebe oder solche der Milch verursachen (Sekretionsstörungen, Katarrhe, Entzündungen). Sie sind rinderpathogen; eine von diesen Arten kann auch menschenpathogen wirken.

Hierher gehören vor allem die große Gruppe der Galtstreptokokken und die seltener vorkommenden pyogenen stark hämolytischen Streptokokken.

Als „apathogene Milchstreptokokken“ bezeichnet man zweckmäßig diejenigen Arten, die zuweilen auch im Euter vorkommen, im allgemeinen aber nicht primär, sondern sekundär in die Milch gelangen und weder tier- noch menschenpathogen sind.

Die bisher festgestellten pathogenen Euterstreptokokken lassen sich nach den Erfahrungen verschiedener in- und ausländischer Versuchsansteller auf Grund ihrer biologischen Merkmale in folgende Haupttypen unterteilen:

1. Strept. agalactiae (sog. Galt-Streptokokkus),
2. atypische Form des Strept. agalactiae,
3. Strept. dysagalactiae,
4. Strept. uberis,
5. Strept. pyogenes (haemolyticus) bzw. Strept. epidemicus,
6. Strept. lanceolatus.

Die unter 3—6 genannten Arten kommen als Erreger von Mastitiden des Rindes sehr selten vor.

Der Strept. lactis (sog. Milchsäurestreptokokkus) kann ebenfalls unter gewissen Bedingungen katarrhalische Mastitiden des Rindes verursachen. — Untersuchungen über die serologische Differenzierung der pathogenen Euterstreptokokken sind im Institut eingeleitet.

26. J. Rodenkirchen (Königsberg/Pr.)[1]:

Untersuchungen über fadenziehenden Rahm[2].

Aus fadenziehendem Rahm wurden 2 Organismen isoliert, die als Reinkulturen in Vollmilch nur die Rahmschicht fadenziehend machten. In Magermilch trat der Fehler nur auf, wenn genügend Sauerstoff zutreten konnte, d. h. in flacher Schicht. Bereits verminderte Sauerstoffzufuhr durch Anlegung der Kultur in hoher Milchschicht hemmte die Erscheinung. Dagegen spielte die fortschreitende Säuerung der Milch als ein den Fehler unterdrückender Faktor — entgegen einer wiederholt geäußerten Meinung — eine untergeordnete Rolle. Bei den Erregern handelte es sich um ein Stäbchen aus der Aerobakter-Gruppe und um eine Sarzine.

Der auf zuckerhaltigen festen Nährböden in Form von stark schleimigen und fadenziehenden Kolonien wachsende Aerogenes-Keim bildete Indol, war zur Assimilation von Zitrat befähigt und lieferte in der Methylrotprobe und in der Voges-Proskauer-Reaktion ein positives Ergebnis. Allerdings gelten diese Befunde für Züchtungstemperaturen zwischen 20 und 30°. Bei 37° trat bereits eine auffällige Entwicklungshemmung ein. Das Schleimbildungsvermögen wie auch die fadenziehende Eigenschaft erwiesen sich auf Agarnährböden als ziemlich sprunghaft, ohne indessen ganz in Verlust zu geraten. Für die vielfach vertretene Anschauung, daß Schleimbildung und Fadenziehendwerden Degenerationserscheinungen sind, ergaben sich jedoch keine Anhaltspunkte. Es war weder eine Phagwirkung nachweisbar, noch gelang eine Umwandlung in eine schleimlose, nichtfadenziehende Normalform unter dem Einfluß von Galle. Der Schleim selbst wird für eine muzinartige Substanz gehalten.

Der zweite von uns isolierte Organismus stellte eine Uebergangsform dar zwischen den Gattungen Mikrokokkus und Sarzina. Typische Sarzinen traten

1) Aus dem Milchwirtschaftlichen Institut der Universitat Königsberg/Pr.
2) Die ausführliche Arbeit erscheint in der Zeitschrift: „Milchwirtschaftliche Forschungen“, Bd. 20.

nur in und auf gewissen Nährböden auf. Schleim wurde von der Ausgangskultur nicht gebildet, so daß als Ursache des Fadenziehens eine besondere klebrige Beschaffenheit der Zellmembran anzunehmen ist. Auffälligerweise erwarb eine Subkultur unter der Einwirkung von Galle die Eigenschaft, Schleim zu produzieren. Das Farbstoffbildungsvermögen unterlag ziemlichen Schwankungen. Der Keim gehörte in die Gruppe der azidoproteolytischen Kokken und wurde als eine der S. aurantiaca nahestehende Form bezeichnet.

27. Josef Gangl (Wien):

Die Bedeutung bakteriologischer Verfahren für die Untersuchung der Lebensmittel[1]).

Für die praktische Lebensmittelkontrolle kommt der mit Hilfe der üblichen bakteriologischen Verfahren durchgeführte Nachweis von Krankheitserregern nur in den seltensten Fällen in Betracht. Da pathogene Keime auch bei intensiven Infektionen meist nur sporadisch in den Untersuchungsobjekten gefunden werden, bleibt das Untersuchungsergebnis bei der geringen verarbeitbaren Materialmenge ein mehr oder weniger zufälliges, und ein mißglückter Nachweis ist noch keinesfalls für die Abwesenheit von Krankheitserregern etwa in anderen Teilen des zur Untersuchung herangezogenen Lebensmittels beweisend.

Nur im Falle der bakteriologischen Fleischbeschau ist es bisher gelungen, durch die Züchtung und Isolierung der Paratyphus- und Enteritiskeime aus dem Tierkörper das Inverkehrsetzen von derartigem, gesundheitsschädlichem Fleisch wirksam zu verhindern. Hier handelt es sich aber um eine Allgemeininfektion des Tierkörpers, die noch zu Lebzeiten erfolgt ist und die sich auf dem Blutwege ziemlich gleichmäßig auf den ganzen Tierkörper verbreitet hat.

Auch bei homogenerem Material erschwert die Durchmischung und Verdünnung mit gesunden Lebensmitteln den Nachweis von Krankheitserregern außerordentlich. So konnten wir z. B. Tuberkelbazillen in Mischmilch nur in Ausnahmefällen feststellen, während deren Erfassung bei einer über das ganze Wiener Milcheinzugsgebiet ausgedehnten Untersuchung im Einzelgemelk mit großer Sicherheit gelang.

Der Schutz des Konsumenten vor der Infektion durch Krankheitserreger aus Lebensmitteln kommt aus den erwähnten und anderen Gründen nicht der Lebensmittelkontrolle zu; er kann nur durch epidemiologische und veterinärpolizeiliche Maßnahmen unmittelbar bei der Herstellung und Gewinnung der Lebensmittel gewährleistet werden.

In Weiterführung dieser an den Erzeugungsstätten geleisteten Arbeit obliegt dem Lebensmittelbakteriologen im wesentlichen die Aufsicht über die Gesund- und Frischerhaltung unserer Nahrungsmittel; hierbei sind die meist verwendeten bakteriologischen Verfahren die Bestimmung der Gesamtzahl und bestimmter Bakteriengruppen sowie die Sterilitätsprüfung.

Im Zusammenhange mit den schon erwähnten Arbeiten über die bakteriologische Beschaffenheit der nach Wien gelieferten Milch habe ich vor nahezu drei Jahren begonnen, alle Milch- und Molkereibetriebe des Aufsichts-

1) Aus der staatlichen Anstalt für Lebensmitteluntersuchung Wien.

gebietes der Wiener staatlichen Lebensmitteluntersuchungsanstalt einer systematischen bakteriologischen Ueberprüfung zu unterziehen. Die Arbeiten wurden vorerst durch die rein technische Unmöglichkeit, mit den normalen Petrischalenkulturen auf die erforderliche hohe Zahl an Keimzählungen zu kommen, sehr gehemmt. Erst die Verwendung des von W. Lorenz[1]) für unsere Zwecke eingerichteten Objektträgerkulturverfahrens nach Frost-Klarenburg[2]) hat durch die damit verbundene außerordentliche Ersparnis an Material, Zeit und insbesondere Wascharbeit die technischen Voraussetzungen für unsere Untersuchungen geschaffen.

In allen Fällen wurde als durchaus verläßlicher und objektiver Wertmesser für die in einem Betriebe herrschende Sauberkeit und Sorgfalt die Gesamtkeimzahl und der Gehalt an Keimen der Coli-Aerogenesgruppe bestimmt. Durch die Aufdeckung von Fehlern und Infektionsquellen in den Betrieben konnte vielfach unmittelbar zu einer Verbesserung der Milch in bakteriologischer Hinsicht beigetragen werden.

Ein Wiener Kindermilchbetrieb lieferte z. B. durch längere Zeit eine Milch, die mehr als 50000 Keime im ccm enthielt. Nach den Ergebnissen der bakteriologischen Kontrolle erfolgte die wesentlichste Steigerung der Keimzahl im Abfüllraume. Nach Erneuerung des schon schadhaft gewordenen Kalkanstriches im Abfüllraume war die Milch auch in bakteriologischer Hinsicht einwandfrei (unter 20000 Keime im ccm). Plötzlich schnellte aber der Coligehalt, der früher sehr niedrig gewesen war, sprunghaft in die Höhe. Die Betriebskontrolle zeigte, daß in den frisch getünchten, unter dem Straßengrund gelegenen Arbeitsraum Kanalwasser eingedrungen war. Die den zu stellenden Anforderungen nicht entsprechende Anlage ist stillgelegt worden.

Die Ergebnisse der vielfachen Kontrollen von Betrieben, die zur Erzeugung von zum Rohgenuß geeigneter Vorzugsmilch, der sogenannten Kindermilch, berechtigt waren, lassen die Forderung begründet erscheinen, daß solche Unternehmungen verpflichtet werden, von sich aus regelmäßig bakteriologische Ueberprüfungen des ganzen Erzeugungsganges durchführen zu lassen.

Bei den Molkereien ergab die bakteriologische Kontrolle, daß die Pasteurisierung in fast allen Betrieben ordnungsgemäß durchgeführt wird und daß der gelegentliche Keimreichtum molkereimäßig behandelter Milch in der Regel auf Nachinfektionen zurückzuführen ist. In der Tabelle I sind Mittelwerte über den Keimgehalt der nach Wien angelieferten und der pasteurisierten Milch wiedergegeben.

Tabelle I.
Keimzahlen der nach Wien gelieferten und der pasteurisierten Milch.

Zeit	Gesamtkeimzahl in 1 ccm	Colikeime in 1 ccm
Januar, Februar	3300000	7800
März, April	5700000	26000
Mai, Juni	4500000	47000
Juli, August	8800000	352000
September, Oktober	6300000	76000
November, Dezember	4700000	20000
Jahresmittel für Liefermilch .	6000000	88000
Jahresmittel für past. Milch .	22000	82

1) Milchw. Forschg **18**, 265 (1937).
2) Z. Fleisch- u. Milchhg. **37**, 61 u. 80 (1927).

Aus den angeführten Mittelwerten ist die mit der Jahreszeit im Zusammenhang stehende Schwankung deutlich zu ersehen. Im einzelnen blieben die Werte für die Gesamtkeimzahlen zwischen 1 und 30 Millionen pro ccm. Für das Jahr 1937 errechnet sich für die Wiener Molkereibetriebe ein mittlerer Pasteurisierungseffekt von 99,7 Proz. Diese befriedigende Leistung wurde in einigen Fällen durch recht bedeutende Nachinfektionen wieder aufgehoben. Beispielsweise stieg in einem Betrieb der Keimgehalt der Milch nur auf dem Wege der Abfüllung in die Flaschen auf das Hundertfache des Gehaltes nach dem Pasteur; in einer anderen Milch wurden bei der angelieferten Milch 1000 Colikeime im ccm gefunden, während dann in der pasteurisierten Flaschenmilch — trotz nachgewiesener einwandfreier Funktion des Pasteurs — 20000 Colikeime pro ccm vorhanden waren.

In allen Fällen konnten die Nachinfektionen, die meist nur auf kleinere, leicht vermeidbare Nachlässigkeiten zurückzuführen waren, nach Aufdeckung der Ursachen beseitigt werden. Z. B. waren einmal ein Treibriemen, von dem Staubteilchen auf den offenen Milchkühler geschleudert wurden, dann wieder lange, winkelige und schlecht gereinigte Rohrleitungen, veralterte und schlecht reinigbare Abfüllvorrichtungen und nicht selten die unsachgemäße Behandlung und Reinigung der Flaschen und Kannen die Ursachen der Nachinfektionen.

Wie bedeutungsvoll wiederholte, bakteriologische Molkereikontrollen für den hygienischen Zustand der Milch auch dann sind, wenn sie nicht unmittelbar zur Aufdeckung einer bestimmten Nachlässigkeit führen, zeigt die Tabelle II; daraus ist auch die Anordnung der Probeentnahmen zu ersehen.

Tabelle II.
Keimzahlen im ccm bei bakteriologischen Molkereikontrollen.

Entnahme	Betrieb 1		Betrieb 2		Betrieb 2	
	Keime	Coli	Keime	Coli	Keime	Coli
Rohmilch	1400000	3800	13200000	16000	11900000	14000
Nach Pasteur . .	750	0	100	0	2100	0
Kuhler	580	0	15000	6300	1500	0
Abfullbassin . . .	3000	0	32000	11800	2600	0
Kanne	3200	0	21000	18700	2700	0

Der Betrieb 1 ist gut geführt. Der Betrieb 2 machte bei der Besichtigung äußerlich zwar einen reinlichen Eindruck, es liegt aber, wie die Zunahme der Colikeime zeigt, doch eine starke Nachinfektion vor. Bei einer späteren Revision (letzte Zahlenreihe) waren die Verunreinigungen beseitigt.

Die angeführten Untersuchungen haben wohl deshalb, weil jeder Betrieb von sich aus schon wegen der damit im Zusammenhange stehenden erhöhten Haltbarkeit die Keimzahl der Milch möglichst niedrig zu halten bestrebt ist, auch ohne gesetzlich verankerte Strafdrohung zu einer tatsächlichen Sanierung der Wiener Molkereibetriebe geführt. Die Ergebnisse gelten aber nur für die Milch, wie sie die Molkereien verläßt. Die Behandlung der Milch in den Verschleißstellen führt oft noch zu umfangreichen Infektionen, die wegen der vorhergegangenen Pasteurisierung oft um so gefährlicher werden können. In der Tabelle III sind Jahresdurchschnittswerte von Untersuchungsergebnissen von Flaschenmilch angegeben, die sich auf laufend bei Verschleißern abgenommene Flaschenmilch beziehen.

Aus den angeführten Zahlen geht eindeutig die unbedingte Notwendigkeit und die Bedeutung einer bakteriologischen Ueberwachung des

Tabelle III.
Jahresdurchschnittswerte des Keimgehaltes von Flaschenmilch.

Molkerei	Gesamtkeimzahl in 1 ccm	Colikeime in 1 ccm
A	61000	399
B	91000	455
C	131000	800
D	890000	55000

Verkehres mit Milch hervor, zudem auch im Falle D die in der Molkerei gezogene Flaschenmilch nicht mehr als 21000 Gesamtkeime und 20 Colikeime im ccm aufwies.

Auch bei der Ueberprüfung anderer Betriebe hat sich die Zuhilfenahme bakteriologischer Methoden als sehr nützlich erwiesen. So wurden in wenig sauber gehaltenen Fleischhauereibetrieben in Abstrichen vom Hackpflock, Fleischwolf und anderen Gerätschaften zahlreiche Bakterien aus der Coligruppe, darunter auch das pathogen wirkende Bact. coli communior und auch Bact. faecalis alcaligensis in reichlicher Menge gefunden. In reinlich geführten Betrieben wurden derartige Mikroorganismen nicht oder nur vereinzelt festgestellt.

Eine besondere Bedeutung gewinnen die bakteriologischen Verfahren auch bei der Untersuchung des Speiseeises. In einem Eis, dessen Genuß für erfolgte Gesundheitsstörungen verantwortlich gemacht wurde, konnten neben gewöhnlichen Colibakterien auch ein gelb wachsender Stamm von Bact. coli luteum und zahlreiche Proteusbakterien nachgewiesen werden.

Ein weiteres großes Gebiet für den Einsatz bakteriologischer Methoden bieten die Feststellung der Genußtauglichkeit und Haltbarkeit von Vollkonserven und die heikle Frage der Beurteilung von Fleischwaren und Fischhalbkonserven. Während für den ersteren Zweck die Feststellung der sinnfälligen Veränderung bei Brutschranktemperatur ausreicht, ist für die Entscheidung, ob länger unter ungünstigen Verhältnissen gelagerte Würste und Fleischerzeugnisse noch genußtauglich sind, schon ein umfangreiches bakteriologisches Rüstzeug erforderlich. Kulturelle Keimzählungen nach den üblichen Plattenverfahren verbieten sich, weil die Zerkleinerung und gleichmäßige Vermischung des Materiales zur Herstellung geeigneter Verdünnungen praktisch unmöglich ist. Bei einer einigermaßen höheren Keimzahl würde die auf solchem Wege erhaltene Keimzahl nur ein Maß für den Zerkleinerungsgrad des Untersuchungsmateriales darstellen. In der Untersuchungspraxis haben sich hier die Durchmusterung von Klatschpräparaten oder Gefrierschnitten (wobei auch die Beobachtung der Lagerung der Bakterien in Bindegewebsspalten oder an Muskelfasern Schlüsse über den Zersetzungsgrad zuläßt) gut bewährt.

Ein weites Betätigungsfeld für den Lebensmittelbakteriologen bildet die bakteriologische Trinkwasseruntersuchung. Gerade bei der Beurteilung von Trinkwasserspendern, die sich auf chemisch-physikalischen und hygienisch-bakteriologischen Untersuchungsverfahren gründet, hat sich die an der Wiener Lebensmitteluntersuchungsanstalt übliche Zusammenarbeit zwischen Hygieniker und Chemiker in vorzüglicher Weise bewährt.

Auch auf vielen anderen Gebieten der Lebensmittelkontrolle sind mikrobielle Untersuchungsverfahren oft von ausschlaggebender Bedeutung (z. B. bei der Qualitätsbeurteilung von Käse, Butter, verschiedenen Fetten, Fruchtsäften, Marmeladen, Paradeismark, Eiern usw.).

Wenn auch bei der Lebensmitteluntersuchung vielfach die bakteriologischen Verfahren durch chemische Methoden zu ersetzen versucht werden, wie es bei den vielen Frischheits- und Verdorbenheitsreaktionen der Fall ist, muß doch die bakteriologische Arbeitsweise dem Gutachter in jedem Falle vertraut sein. Dazu zwingen die raschen Veränderungen, die besonders Kohlehydrate und Proteine durch das Wachstum von Mikroorganismen erleiden, zur Beachtung dieser Vorgänge bei analytischen Feststellungen. So gelingt z. B. die Bestimmung des Wassergehaltes in eiweißhaltigen Produkten (Würste) bei einigermaßen fortgeschrittener Zersetzung nicht mehr.

Auch in einem recht absonderlichen Fall einer abweichenden Milchfettzusammensetzung konnte die bakteriologische Untersuchung eine gewisse Aufklärung bringen. Bei mehreren Landbutterproben gleicher Herkunft wiesen die chemischen „Konstanten" auf eine angenähert 50proz. Verfälschung hin. Schließlich wurde aber die gleiche Fettzusammensetzung auch bei der unverfälschten Milch festgestellt. Die bakteriologische Untersuchung der Milch ergab die Anwesenheit reichlicher Mengen von Bakterien und Eiterzellen und auch Tuberkelkeime konnten nachgewiesen werden. Somit scheint eine solche Infektion auch eine Verschiebung in der Zusammensetzung des Milchfettes bewirken zu können.

Bei der großen Bedeutung bakteriologischer Verfahren für die Lebensmitteluntersuchung ist es bedauerlich, daß an verschiedenen Stellen gewonnene Ergebnisse wegen der uneinheitlichen Arbeitsmethoden nur in beschränktem Ausmaße unmittelbar miteinander verglichen werden können. Deshalb hat die Anwendung bakteriologischer Untersuchungsverfahren bei der Beurteilung der Lebensmittel gegenwärtig nur dann, wenn sie mit einer reichen persönlichen Erfahrung verbunden ist, Aussicht auf Erfolg. Hier würde eine entsprechende Arbeitsgemeinschaft durch Festlegung und Vereinheitlichung der wichtigsten Untersuchungsverfahren sehr viel zur weiteren Verbreitung und Anwendung der für eine geordnete Lebensmittelkontrolle unerläßlichen bakteriologischen Methoden beitragen können.

28. Pels Leusden (Kiel)[1]:

Erkrankungen an Bangscher Infektion in Schleswig-Holstein 1937/38.

Manche Frage über Infektionen mit Bacterium abortus Bang ist noch ziemlich ungeklärt. Da der Erreger bekanntlich vorzugsweise Rinder befällt, und nur ab und zu auf Menschen übertragen wird, würde uns z. B. interessieren, ob dem gehäuften Vorkommen von Bangerkrankungen beim Menschen mit in Deutschland etwa durchschnittlich 5—600 Fällen auch ein gehäuftes Auftreten der Infektion unter den Rinderbeständen entspricht.

Leider besitzen wir auch heute noch keine genauen Zahlen über die Bangverseuchung der Rinder. Wir wissen nur, daß die Verseuchung regionär sehr verschieden und auch stark von der Größe der Rinderbestände abhängig ist, d. h. je größer die Bestände, um so größer die Verseuchung. Alles in allem

1) Aus dem Hygienischen Institut der Universität Kiel (Direktor: Prof. Dr. W. Bachmann).

wird man, wie Zeller angibt, nicht fehlgehen, wenn man annimmt, daß in Deutschland etwa 10—12 Proz. der über 1 Jahr alten Rinder einmal mit Bangbakterien infiziert waren oder noch infiziert sind. In anderen außerdeutschen Ländern soll die Verseuchung noch sehr viel größer sein als bei uns.

Während die Ziffer der Erkrankungen des Menschen bei uns in Schleswig-Holstein, wo bekanntlich relativ viele solcher Infektionen vorkommen, nach Bekanntwerden der ersten Fälle zunächst anstieg, hielt sich die Zahl der Infektionen in den darauf folgenden Jahren ungefähr auf gleicher Höhe und betrug in jedem Jahre durchschnittlich etwa 80 Fälle. Verfolgt man demgegenüber die Zahlen aus dem übrigen Reich, so findet man keine Uebereinstimmung, obwohl in den abgelaufenen Jahren die Gesamtzahl der Fälle nur unwesentlich schwankt.

Während nämlich die Gesamtzahl der Erkrankungen sich in Schleswig-Holstein schon mehrere Jahre fast unverändert auf der gleichen Höhe gehalten hat, variieren die Zahlen in den übrigen Ländern und Bezirken zum Teil ziemlich beträchtlich und betragen in manchen Jahren das Doppelte oder sogar das Dreifache von dem anderer Jahre. In manchen Teilen Deutschlands hat es den Anschein, als ob der Höhepunkt der Bangerkrankungen bereits überschritten ist, in anderen Gebietsteilen sehen wir dagegen ein weiteres Ansteigen der Erkrankungsziffern. Wieder in anderen Teilen nimmt die Zahl, ähnlich wie bei uns in Schleswig-Holstein, weder erheblich zu noch erheblich ab.

Tabelle I.

Provinzen und Länder	1931/32	1932/33	1933/34	1934/35	1936	1937	1938
Preußen	379	324	390	399	425	395	
Schleswig-Holstein	73	70	72	101	82	80	50
Niederschlesien	50	50	48	48	55	37	
Sachsen	39	30	53	43	53	44	
Hannover	53	28	41	39	41	56	
Brandenburg	41	51	48	39	40	40	
Ostpreußen	42	20	27	26	33	24	
Rheinprovinz	23	24	42	34	29	33	
Hessen-Nassau	8	8	10	25	27	26	
Westfalen	10	15	14	16	25	25	
Pommern	26	21	22	22	19	20	
Oberschlesien	13	7	13	6	19	10	
Posen Westpreußen	1	—	3	2	2	—	
Bayern	29	32	40	40	33	56	
Sachsen	20	35	31	28	38	38	
Hamburg	22	37	22	15	17	25	
Mecklenburg	20	19	19	15	15	25	
Bremen	7	5	7	2	7	9	
Lübeck	4	2	7	—	—	—	
Oldenburg	3	8	7	—	13	4	
Braunschweig	7	11	3	2	8	4	
Württemberg	1	9	3	10	18	6	
Baden	—	—	—	—	12	12	
Hessen	—	—	—	—	7	9	
Anhalt	3	11	1	2	3	3	
Thüringen	—	—	—	—	2	4	
Schaumburg-Lippe	2	—	—	—	1	2	
	497	493	533	515	599	592	

Es ist auffallend, daß wir in Schleswig-Holstein für das Jahr 1938 plötzlich einen steilen Abfall der Erkrankungsziffern von 80 auf 48 Fälle finden. Da mir noch keine amtlichen Zahlen aus dem übrigen Deutschland vorlagen, habe

ich mich an eine größere Zahl Medizinaluntersuchungsämter mit der Bitte gewandt, mir die Zahl der Bangfälle für 1937 und 38 mitzuteilen.

Soweit sich aus diesen Mitteilungen bis jetzt übersehen läßt, zeigt sich auch fur 1938 noch keine Abnahme; die vorliegenden Zahlen weisen eher auf eine Zunahme hin.

Die hohe Ziffer von menschlichen Bangerkrankungen in Schleswig-Holstein wird gewöhnlich mit der relativ großen Zahl landwirtschaftlicher Betriebe erklärt.

Folgende Tabelle enthält nebeneinander Gesamtfläche in qkm, Einwohnerzahl, Rinderbestand und Bangerkrankungen Schleswig-Holsteins bzw. des Deutschen Reiches. So besitzen wir ein anschauliches Bild über die Häufigkeit der Bangerkrankungen Schleswig-Holsteins im Verhältnis zum Deutschen Reich (3. Reihe der Tabelle). In der 4. Reihe endlich habe ich noch die Prozentzahlen angegeben, die sich errechnen, wenn wir die Zahlen für Schleswig-Holstein und für das übrige Deutschland, also ohne Schleswig-Holstein in Beziehung zueinander setzten.

Tabelle II.

	Fläche in qkm	Einwohner-zahl	Rinder-bestand	Bang-erkrankungen
Schleswig-Holstein	15 072	1 596 811	957 000	80
Deutsches Reich	468 780	65 335 879	19 123 000	540
in Proz.	3,09 Proz.	2,44 Proz.	4,97 Proz.	14,8 Proz.
Schleswig-Holst.: übr. Deutschl.	3,3 Proz.	2,57 Proz.	5,2 Proz.	17,4 Proz.

2 3,35
7,3

Wie wir sehen, beherbergt Schleswig-Holstein nur 2,44 Proz. der Einwohner Deutschlands. Auf jeden Einwohner kommen etwa doppelt soviel Rinder als im Durchschnitt. Die Zahl der Bangerkrankungen beträgt demgegenüber das etwa 6fache dessen, was wir nach der Einwohnerzahl erwarten würden bzw. das 3fache von dem, was nach der Zahl der vorhandenen Rinder an Erkrankungen anzunehmen wäre. Daraus ergibt sich, daß die Zahl der Bangerkrankungen bei uns in Schleswig-Holstein tatsächlich abnorm hoch gewesen ist, eine Tatsache, die jedenfalls nicht allein durch den relativ höheren Rinderbestand erklärt werden kann.

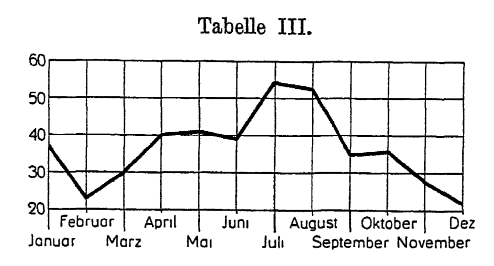
Wenn wir bei diesem Vergleich Deutschland ohne Schleswig-Holstein berücksichtigen, sind die Zahlen noch eindrucksvoller: Nun ergibt sich zwischen Einwohnerzahl auf der einen und Bangerkrankungen auf der anderen Seite das Verhältnis von 1: 7 und zwischen Rinderbestand und Bangerkrankungen ein solches von 1: 3.

Wenn ich auch nicht in der Lage bin, eindeutiges Zahlenmaterial vorlegen zu können, möchte ich doch annehmen, daß wahrscheinlich die Verseuchung unter den Rinderbeständen in Schleswig-Holstein eine überdurchschnittlich große sein muß.

Um eine Uebersicht über die monatliche Verteilung der menschlichen Bangerkrankungen zu bekommen, habe ich das mir aus Schleswig-Holstein zur Verfügung stehende Material von etwa 600 Fälle nach Monaten geordnet.

In den einzelnen Jahren ergibt sich dabei keine gänzliche Uebereinstimmung; dazu sind auch wohl die Zahlen zu klein. Aus der Gesamtheit der Monatsziffern aber zeigt sich ein, alle übrigen Monatsziffern überragendes Maximum für Juli und August. Eine weniger große Häufung fand sich außerdem ganz regelmäßig im Januar, während die Monate Dezember und Februar die niedrigsten Erkrankungsziffern aufwiesen, die zusammengezählt nicht annähernd die Maxima von Juli und August erreichten. Leider sind die Bangfälle bisher in Deutschland in dieser Weise noch nicht zusammengestellt worden, so daß sich nicht sagen läßt, inwieweit diese jahreszeitlichen Häufungen Allgemeingültigkeit haben.

Tabelle III.



Weigmann hat bereits 1931 darauf hingewiesen, daß im allgemeinen eine Uebereinstimmung zwischen Krankheitsbild - Infektionsgelegenheit und serologischem Befund besteht. Die Wahrscheinlichkeit, daß bei wahllos ausgeführten serologischen Untersuchungen gelegentlich positive Resultate gefunden werden, ohne daß klinisch Anzeichen für eine derzeitige Banginfektion vorhanden sind, muß um so größer sein, je länger die Reaktionen nach Ablauf der Erkrankungen andauern, je häufiger die Infektion als solche vorkommt und je öfter unspezifische Reaktionen auftreten.

Nach unseren Erfahrungen ist die Agglutinationsprobe gewöhnlich in etwa 1, bis spätestens 2 Jahren praktisch so weit abgeklungen, daß — wenn nicht durch eine — so doch durch mehrere in Abständen ausgeführte serologische Reaktionen gewöhnlich eine Klärung möglich ist.

Folgende Tabelle zeigt den Verlauf der Agglutinationsreaktion bei häufiger Nachkontrolle innerhalb eines Jahres. Ein ganz ähnliches Bild ergibt sich auch bei mehreren anderen Fällen, in denen wir den Agglutinationstiter in seiner Stärke über eine längere Zeitspanne verfolgen konnten.

Tabelle IV.

1937	Titer	1938	Titer
23. 9.	1:20000	4. 1.	1:1000
5. 10.	1:20000	13. 1.	1:1000 schw.
26. 10.	1:10000	22. 1.	1:200
8. 11.	1:5000	4. 2.	1:1000
15. 11.	1:5000	21. 2.	1:100
6. 12.	1:5000	4. 4.	andeutungsweise
18. 12.	1:2000		

Da außerdem der Prozentsatz der Bangerkrankungen selbst in Schleswig-Holstein im Verhältnis zur Gesamtbevölkerung gering ist, und da unspezifische Reaktionen praktisch nicht vorkommen, sind die Fälle mit positiver Agglutinationsprobe bei klinisch negativem Befund in der Tat sehr selten.

Die 1937—38 in der Medizinaluntersuchungsabteilung Kiel ermittelten 128 Fälle Bangscher Krankheit waren 9mal mit Wahrscheinlichkeit nur auf Kontaktinfektion, 63mal nur auf den Genuß roher Milch zurückzuführen. Bei weiteren 34 Fällen kam Kontaktinfektion oder rohe Milch ursächlich in Frage. Bei dem Rest der Fälle ist uns die mögliche Ursache der Infektion nicht bekannt geworden.

Aussprache.

J. Bürgers (Königsberg):

Zur Besserung der Milchhygiene bedarf es der tatkräftigen Zusammenarbeit aller beteiligten Stellen. Bezüglich der Wasserversorgung der Molkereien sollte man aber die Anforderungen nicht übertreiben. Die Begutachtung sollte in den Händen des Hygienikers liegen. Die Aufrahmungsfrage soll hinter wichtigere hygienische Forderungen zurücktreten. Die Infektiosität von Bang ist nicht so groß, wie man ursprünglich annahm, denn sonst müßten bei der weiten Verbreitung bei Rind und Pferd mehr Infektionen beim Menschen vorkommen. Stumme Feiung scheint in Ostpreußen viel vorzukommen, und erklärt das seltene Vorkommen klinischer Fälle.

M. Gundel (Gelsenkirchen):

Die von uns aus der Verkaufsmilch isolierten hämolytischen Streptokokken stimmen auf Grund aller Eigenschaften mit den vom Menschen aus Krankheitsprozessen häufig zu isolierenden hämolytischen Streptokokken überein. Bei dem großen Material, das der Humanmediziner ständig zu sehen gewohnt ist, dürften die von Seelemann vermuteten Fehldiagnosen kaum möglich sein. Außerdem waren diese Streptokokken ja auch serologisch identisch mit den aus menschlichen Krankheitsprozessen isolierten Stämmen. Wir begrüßen sehr die soeben verabredete Gemeinschaftsarbeit des Milchbakteriologen mit den Humanbakteriologen. Es ist dringend erforderlich, daß das gesamte Streptokokkenproblem unter einheitlichen Gesichtspunkten gemeinsam bearbeitet wird.

M. Seelemann (Kiel) Schlußwort.

K. Demeter (Weihenstephan/München) Schlußwort.

M. Gundel (Gelsenkirchen) Schlußwort.

3. Tag: Mittwoch, den 29. März 1939.

Versammlungsleiter: Süpfle (Hamburg) und Sartorius (Berlin).

Sammelbericht V: H. Schlossberger[1]) (Berlin):

Entwicklung, Wesen und Möglichkeiten der Chemotherapie bakterieller Infektionen.

Schon von jeher war das Bestreben der Aerzte darauf gerichtet, bei den sog. ansteckenden Krankheiten, bei denen ja die schädliche Wirkung einer übertragbaren und offenbar auch vermehrungsfähigen Noxe am augenfälligsten zu Tage liegt, eine ursächliche Therapie zu treiben, d. h. eine Heilung durch Vernichtung oder Austreibung des krankmachenden Stoffes herbeizuführen. Trotzdem die medizinische Forschung erst etwa während der letzten 80 Jahre einiges Licht in das Dunkel der Aetiologie und Pathologie der infektiösen Erkrankungen gebracht hat, so war man doch schon viel früher davon überzeugt, daß bei solchen Krankheiten nur eine ursächliche, d. h. eine radikale Behandlung, welche also das Uebel an der Wurzel angreift,

1) Aus der Abteilung für experimentelle Therapie (Abteilungsdirektor: Prof. Dr. Schlossberger) des Instituts Robert Koch.

wirklichen Nutzen schaffen könne. So hat der Veroneser Hieronymus Fracastorius (1478—1553) wohl als einer der ersten die Forderung aufgestellt, daß der Arzt bei der Behandlung infektiöser Erkrankungen versuchen müsse, die „Kontagien" im Organismus abzutöten oder, soweit dies nicht möglich ist, dieselben wenigstens abzuschwächen oder auszutreiben.

Zur Erleichterung dieses Zieles hat man zum Teil auf Grund der sonderbarsten Vorstellungen die verschiedensten Substanzen tierischer, pflanzlicher und mineralischer Herkunft zur Anwendung gebracht. Bekanntlich wurden durch dieses rein empirische Verfahren tatsächlich einige wirkliche Erfolge erzielt, nämlich bei der Syphilis und bei der Malaria durch die Auffindung der Heilwirkung des Quecksilbers bzw. der Chinarinde, in gewissem Maße auch bei der tropischen Dysenterie durch den Nachweis der therapeutischen Eigenschaften der brasilianischen Ruhrwurzel, der Radix Ipecacuanhae, deren wesentlicher Bestandteil, das Emetin, wohl ebenfalls eine direkte Wirkung auf die in der Darmschleimhaut der Patienten vegetierende Entamoeba histolytica ausüben dürfte. Einen besonders umwälzenden und auch anregenden Einfluß hatte die Entdeckung der therapeutischen Wirksamkeit der Chinarinde beim Wechselfieber. Während man beim Quecksilber und bei der Ipecacuanha, die beide eine Verstärkung der Ausscheidungen bewirken, zunächst an eine Entfernung der unreinen Stoffe mit den Exkreten aus dem Körper dachte, konnte bei der Chinarinde eine solche Elimination „fauler" Stoffe als Ursache des therapeutischen Effekts nicht in Frage kommen. Hier hat vor allem der Engländer Thomas Sydenham (1624—1689) die Meinung ausgesprochen, daß die Chinarinde eine spezifische Wirkung auf die in die Säftemasse eingedrungene Krankheitsmaterie, auf das Kontagium der Malaria ausübe und daß es die fernere Aufgabe der Heilkunde sein müsse, nach weiteren derartigen spezifischen Heilmitteln zu suchen.

Auffallend ist nun aber, daß die genannten Erfolge, welche die Empirie auf dem Gebiete der ätiologischen Therapie gezeitigt hat, ausschließlich Erkrankungen betreffen, die, wie wir heute wissen, durch Protozoen, nämlich Spirochäten, Plasmodien und Amöben hervorgerufen werden. Dagegen haben sich bei den nach unseren heutigen Kenntnissen durch Bakterien bedingten Infektionskrankheiten, besonders bei den hierher gehörigen chronischen Leiden, wie Tuberkulose und Lepra, trotz zahlreicher Versuche keine eindeutigen Heilwirkungen erreichen lassen. Außerordentlich groß ist zwar die Zahl der zur Behandlung solcher Erkrankungen empfohlenen Medikamente. Ohne auf Einzelheiten einzugehen, sei hier nur erwähnt, daß es vor allem Schwermetall-, Arsen- und Antimonverbindungen, ferner auch aus bestimmten Pflanzen hergestellte Zubereitungen, sowie pflanzliche und tierische Oele u. dgl. waren, die in den früheren Zeiten, zum Teil schon im Altertum und Mittelalter, eine ausgiebige Anwendung bei der Behandlung der verschiedensten Infektionskrankheiten gefunden haben. Ein wirklicher Erfolg blieb aber diesen Bestrebungen, wie bereits betont, versagt. Es wäre aber zweifellos nicht richtig, wollte man allen diesen damaligen Bemühungen jeden Wert absprechen. Es sei nur daran erinnert, daß z. B. der heutige Gebrauch des Lebertrans, des Jodkaliums, der Salizylsäure und ihrer Derivate, der Goldpräparate und mancher anderer Substanzen bei bestimmten infektiösen Erkrankungen eigentlich auf diesem früheren wahllosen Herumprobieren basiert.

Diese Bemühungen, gerade bei bakteriellen Infektionskrankheiten eine Heilung mit Hilfe chemischer Substanzen herbeizuführen, haben zu Beginn der bakteriologischen Aera, vor allem durch die grundlegenden Untersuchungen von Joseph Lister und Robert Koch über Antisepsis und Desinfektion einen besonderen Auftrieb erfahren. Man stellte sich damals vor, daß es in

gleicher Weise wie im Reagenzglas auch im infizierten Körper gelingen müsse, pathogene Bakterien durch stark bakterizid wirkende Chemikalien abzutöten oder wenigstens in ihrer Entwicklung zu hemmen. Dabei ergab sich indessen, daß bei den mit pathogenen Bakterien infizierten Versuchstieren selbst maximal erträgliche Mengen derartiger Desinfektionsmittel keinerlei Beeinflussung des Krankheitsverlaufs zu bewirken vermochten. Die Ursache dieses Versagens liegt bekanntlich darin, daß die verwendeten Antiseptika mit Bestandteilen der Gewebe und Flüssigkeiten des Makroorganismus in Reaktion treten und deshalb auf die Bakterien überhaupt nicht oder jedenfalls nicht in ausreichendem Maße einzuwirken vermögen.

Es erübrigt sich, hier auf die Ergebnisse der von einer Reihe von Autoren durchgeführten Untersuchungen über diese sog. „innere Desinfektion" im einzelnen einzugehen. Des historischen Interesses halber seien hier nur die von Robert Koch selbst angestellten Versuche erwähnt, nach denen es nicht möglich ist, Meerschweinchen durch Sublimatgaben, welche nach den Resultaten der Reagenzglasversuche zur vollkommenen Verhinderung des Milzbrandbazillenwachstums längst hätten ausreichen müssen, gegen eine experimentelle Milzbrandinfektion zu schützen. Ebensowenig gelang es ihm, bei tuberkulösen Meerschweinchen mit Zyangoldverbindungen (Aurum Kalium cyanatum), die in vitro noch in einer Verdünnung von 1 : 2 Millionen die Entwicklung der Tuberkelbazillen verhinderten, irgendwelche Heilwirkungen zu erzielen.

Durch die Entdeckung der Antikörper und der passiven Uebertragbarkeit der Immunität haben dann diese Bestrebungen, bakterielle Infektionskrankheiten mittels chemischer Mittel zur Heilung zu bringen, eine vorübergehende Unterbrechung erfahren. Dachte man damals doch, daß die Behandlung infektiöser Erkrankungen mit den durch eine maximale Spezifität ausgezeichneten Immunsera das lange gesuchte ideale Heilverfahren darstelle. Nachdem sich aber herausgestellt hatte, daß die Heilserumtherapie nur bei manchen, besonders den durch toxinbildende Bakterien hervorgerufenen Infektionen günstige Wirkungen herbeizuführen vermag, aber bei anderen, hauptsächlich auch den chronischen bakteriellen Erkrankungen, vollkommen versagt, wurde die Erprobung chemischer Substanzen auf ihren Heilwert bei derartigen Affektionen erneut und auf breiterer Basis wieder aufgenommen. Dies um so mehr, nachdem sich in der Zwischenzeit diese Art der Behandlung bei den durch Trypanosomen und Spirochäten, später auch bei den durch andere Protozoen hervorgerufenen Erkrankungen von Mensch und Tieren als außerordentlich aussichtsreich erwiesen hatte und im Laufe der Jahre zu einer Reihe früher nicht geahnter Erfolge führte.

Ausschlaggebend für diese erfolgreiche Entwicklung der Therapie infektiöser Krankheiten war unzweifelhaft die zunächst bei bestimmten Protozoenerkrankungen gewonnene Erkenntnis, daß wirkliche Heilerfolge hier nur von solchen chemischen Substanzen zu erwarten sind, die sich den Zellen und Säften des Organismus gegenüber möglichst neutral verhalten und elektiv auf die Krankheitsursache einwirken. Es ist das Verdienst von P. Ehrlich, auf die Bedeutung dieses „distributiven Prinzips" hingewiesen, sowie den Nachweis für seine Durchführbarkeit erbracht und dadurch die Grundlage für den erfolgreichen Ausbau der Chemotherapie der Infektionskrankheiten geschaffen zu haben.

Da ich bereits mehrfach an anderen Stellen die experimentellen Beweise für die Richtigkeit des chemotherapeutischen Behandlungsprinzips eingehend dargelegt habe, sei hier, um Wiederholungen zu vermeiden, lediglich darauf

hingewiesen, daß ebenso wie die Serumtherapie auch die Chemotherapie letzten Endes darauf beruht, daß sich die einzelnen Lebewesen hinsichtlich der chemischen Zusammensetzung ihrer Körpersubstanz und auch bezüglich ihres Stoffwechsels voneinander unterscheiden. Dadurch, daß das Protoplasma der Infektionserreger andere Affinitäten aufweist als die Bestandteile des Makroorganismus, oder daß zwischen Makro- und Mikroorganismus hinsichtlich des Stoffaustauschs Unterschiede bestehen, ist die Möglichkeit einer elektiven Beeinflussung der im erkrankten Körper lebenden Parasiten durch spezifisch wirkende Substanzen, d. h. einerseits durch Antikörper, andererseits durch Chemotherapeutika, gegeben und ohne weiteres verständlich.

Nach den zunächst an Protozoen, vor allem an Trypanosomen gewonnenen Erkenntnissen handelt es sich bei der chemotherapeutischen Heilung ebenso wie bei der Wirkung antikörperhaltiger Immunsera um einen aus mehreren Phasen bestehenden Vorgang. Nach den experimentellen Ergebnissen hat man sich vorzustellen, daß in der 1. Phase des Heilungsprozesses die Aufnahme des Heilmittels durch die Parasitenzelle stattfindet, wobei neben chemischen Affinitäten vermutlich auch physikalische Momente eine Rolle spielen. Sodann folgt in der 2. Phase die eigentliche toxische Wirkung der verankerten Substanz auf das Mikrobenprotoplasma, welche in Störungen fermentativer Vorgänge oder der Fortpflanzung besteht. Zu einer Abtötung der Erreger kommt es aber dadurch in der Regel nicht, vielmehr werden die Mikroorganismen durch die Beeinflussung des Stoffwechsels im allgemeinen nur in ihren Lebensfunktionen, vor allem in ihrer Vermehrung derart beeinträchtigt, daß sie den in der 3. Phase in Aktion tretenden Abwehrmaßnahmen des Organismus anheimfallen. Das Primäre des chemotherapeutischen Heilungsvorganges ist also stets eine durch direkte Einwirkung des Heilmittels bedingte Schädigung der Parasiten; erst sekundär treten die antiinfektiösen Funktionen des erkrankten Körpers in Tätigkeit und machen die gewissermaßen sensibilisierten Erreger durch Phagozytose, Abkapselung u. dgl. vollends unschädlich.

Es erhebt sich nun aber die wichtige Frage, ob diese bei pathogenen Protozoen gewonnenen Erkenntnisse auch für Infektionserreger aus den beiden anderen Klassen, nämlich für bakterielle Krankheitskeime und für die filtrierbaren Virusarten Gültigkeit haben.

Entsprechend den vorausgegangenen Darlegungen wäre eigentlich zu erwarten gewesen, daß die Auffindung von spezifischen, auf bestimmte Bakterienarten eingestellten chemischen Mitteln leichter sein müßte als die chemotherapeutische Beeinflussung von Krankheitserregern, welche in die Klasse der Protozoen gehören. Stellen doch die Zellen z. B. der Trypanosomen Gebilde dar, die in ihrem Aufbau den Zellen der Metazoen, wie sie der infizierte Tierkörper aufweist, in weitgehendem Maße ähnlich sind. Die Möglichkeit, daß eine auf Parasiten wirkende Substanz gleichzeitig eine starke Organotropie besitzt, war also bei den Protozoen doch viel naheliegender als bei den Bakterien, die den tierischen Zellen absolut nicht gleichen, sondern eine nahe Verwandtschaft mit den Pflanzenzellen besitzen oder mit diesen zu identifizieren sind.

Diese Annahme hat sich jedoch nicht als richtig erwiesen. Die Bakterien stellen im Gegensatz zu den durch chemische Substanzen der verschiedensten Gruppen relativ leicht zu beeinflussenden Protozoen ein verhältnismäßig sprödes Material dar. Selbst die Auffassung, daß mit der morphologischen Verschiedenheit von Tier- und Pflanzenzelle auch tiefgreifende Unterschiede im biochemischen Verhalten verbunden sind, trifft bekanntlich nicht zu;

es sei hier nur auf die Partialantigengemeinschaften hingewiesen, welche nach den Befunden einer Reihe von Autoren (Jijima, Doerr u. Hallauer, Eisler, Eisler u. Howard, Landsteiner u. Levine, Witebsky, Neter u. Sobotka, Meyer u. Palmer, Kendall, Heidelberger u. Dawson, Hoagland, Beeson u. Goebel u. a.) die Zellbestandteile gewisser Säugetierarten und bestimmter Bakterien aufweisen. Dazu kommt dann aber noch, daß die krankheitserregenden Bakterien schon infolge ihrer Membran, manche Arten noch infolge besonderer Hüllen äußeren Einflüssen, speziell auch chemischen Einwirkungen gegenüber im allgemeinen eine bedeutend höhere Resistenz aufweisen als die pathogenen Protozoen. Weiter besitzen sie im Vergleich mit diesen eine wesentlich größere Vermehrungsgeschwindigkeit und wahrscheinlich auch eine gesteigerte Anpassungsfähigkeit an veränderte Lebensbedingungen, wodurch ihre wirksame Beeinflussung im infizierten Organismus ebenfalls erheblich erschwert wird. Sodann wäre die im Vergleich mit den pathogenen Protozoen nur sehr geringe Größe der bakteriellen Infektionserreger zu erwähnen, die es ihnen in hohem Maße gestattet, in Zellinterstitien usw. sich der schädigenden Wirkung der im zirkulierenden Blute und auch in den Zellen enthaltenen keimwidrigen Substanzen zu entziehen. So sei in diesem Zusammenhang daran erinnert, daß manche bakteriellen Krankheitserreger, wie z. B. die Tuberkel- oder die Gasödembazillen großenteils in schlecht durchbluteten nekrotischen Gewebspartien enthalten sind und dadurch von antibakteriell wirkenden Stoffen nur schwer erreicht werden.

Die geringe Größe der zur Klasse der Bakterien gehörigen Krankheitserreger und der wenig differenzierte Aufbau ihres Protoplasmas (vgl. auch Hörlein) machten es schließlich auch noch wahrscheinlich, daß sich bei ihnen der ganze Lebensvorgang in einfacheren Formen abspielt, als bei den doch wesentlich höher entwickelten, mit Kernen, Geißeln und sonstigen Organellen ausgestatteten Protozoen, in deren Körper zweifellos die verschiedenartigsten Assimilations- und Dissimilationsvorgänge stattfinden. Je komplizierter aber der Aufbau und der Stoffwechsel eines Krankheitserregers ist, um so mehr Angriffspunkte wird er einer chemotherapeutischen Beeinflussung bieten, d. h. um so größer wird die Möglichkeit seiner elektiven Schädigung durch chemische Substanzen im infizierten Organismus sein.

Von diesem Standpunkt aus gesehen, ist es also zweifellos kein Zufall, daß nicht nur die alten Aerzte bei der mehr oder weniger wahllosen, großenteils auf sicherlich falschen Vorstellungen beruhenden Anwendung der verschiedensten chemischen Substanzen lediglich Heilmittel zur Behandlung von Protozoenkrankheiten gefunden haben, sondern daß auch die moderne chemotherapeutische Forschung ihre ersten Erfolge bei derartigen Erkrankungen erzielt hat. Demzufolge mußte es aber überhaupt recht zweifelhaft erscheinen, ob dieselben Gesichtspunkte und Ueberlegungen, welche bei Spirochäten-, Trypanosomen- und anderen Protozoenkrankheiten die Darstellung wirksamer Medikamente ermöglichst haben, auch für die Auffindung von Chemotherapeutika gegen bakterielle Infektionen Gültigkeit besitzen.

Diese Frage ist durch die Forschungsergebnisse der letzten Jahre im bejahenden Sinne entschieden worden. Allerdings haben schon vorher im Anschluß an die bei Trypanosen und Spirochätosen erzielten Erfolge zahlreiche Autoren versucht, mit Hilfe chemischer Substanzen auch eine wirksame Beeinflussung bakterieller Infektionen herbeizuführen und zum Teil über günstige Ergebnisse berichten können. Vor allem wären hier die Untersuchungen von Morgenroth und seinen Mitarbeitern mit Chinin- und

Akridinderivaten besonders bei Pneumokokken- und Wundinfektionen, von Feldt (s. auch Schiemann u. Feldt), Möllgaard u. a. mit Goldverbindungen bei Tuberkulose und Streptokokkeninfektionen, von der Gräfin Linden mit Kupferpräparaten bei Tuberkulose, weiter von Schuster, Bettmann u. Laubenheimer, Bierbaum, Kolle u. Schlossberger, sowie Christison mit Arsinsäuren und Arsenobenzolderivaten bei Milzbrand und Schweinerotlauf zu erwähnen. Indessen waren die Meinungen darüber noch sehr geteilt, ob diese vielfach unsicheren und ungenügenden, zum Teil auch nicht regelmäßig reproduzierbaren Heilwirkungen als Chemotherapie in dem vorhin beschriebenen Sinne oder aber etwa nur als Ausdruck einer Steigerung der Abwehrmaßnahmen des infizierten Organismus, d. h. also einer lediglich indirekten Beeinflussung der Erreger anzusehen sind. Durch die Auffindung und ausgiebige Erprobung der besonders bei bestimmten Kokkeninfektionen therapeutisch wirksamen Sulfonamidverbindungen wurde indessen der Beweis dafür erbracht, daß auch bei den durch Bakterien und ebenso, wie hier nur beiläufig erwähnt sei, bei den durch filtrierbare Vira hervorgerufenen Erkrankungen die Möglichkeit einer wirksamen direkten Beeinflussung der Erreger im infizierten Organismus durchaus gegeben ist. Es sei hier nur darauf hingewiesen, daß nach den Feststellungen zahlreicher Autoren und auch nach eigenen Ergebnissen (s. Schlossberger und Bär) die Heilwirkung der genannten Substanzen sowohl bei den Kokkenerkrankungen als auch bei dem durch ein filtrierbares Virus hervorgerufenen Lymphogranuloma inguinale offenbar in prinzipiell ähnlicher Weise zustande kommt, wie der chemotherapeutische Effekt bei Protozoeninfektionen, daß es sich also allem Anschein nach auch hier um einen sich aus mehreren Phasen zusammensetzenden komplexen Vorgang handelt, wie er bereits vorhin geschildert wurde. Nur kurz sei hier erwähnt, daß es nach den Befunden von Schnabel, Wohlfeil und seinen Mitarbeitern, Lockwood, v. Jancsó u. a. sehr wahrscheinlich ist, daß ebenso wie bei den Protozoen (N. u. H. v. Jancsó u. a.) auch bei den bakteriellen Krankheitserregern gewisse Fermente den Angriffspunkt der Chemotherapeutika im Parasitenprotoplasma bilden. So konnte neuerdings v. Jancsó zeigen, daß die Heilwirkung bestimmter Goldverbindungen bei Kokkeninfektionen darauf beruht, daß bestimmte Fermente der Mikrobenzelle mit dem Metall katalytisch inaktive Verbindungen bilden.

Einer kurzen Besprechung bedürfen hier noch die eben genannten, bei verschiedenen bakteriellen Infektionen mit gewissem Erfolg erprobten Chinin-, Akridin-, Arsen- und Schwermetallverbindungen hinsichtlich der Frage ihres Wirkungsmechanismus. Wie bereits angedeutet, stehen einige Autoren, vor allem Feldt, Siegmund, sowie die Tuberkuloseärzte auf dem Standpunkt, daß die therapeutische Wirkung chemischer Substanzen bei Infektionskrankheiten ganz allgemein, im besonderen aber die Heilwirkung von Goldverbindungen bei geeigneten Fällen von Tuberkulose stets auf einer Funktionssteigerung des Retikuloendothels beruhen und daß eine direkte Beeinflussung der Erreger durch chemische Mittel im Organismus nicht möglich sein soll. Aus Gründen, die an anderer Stelle ausführlich dargelegt wurden, habe ich diese Anschauung, zunächst soweit es sich um die bei Spirochäten- und Protozoenerkrankungen wirksamen Chemotherapeutika, wie Salvarsan, Antimonpräparate, Germanin, Plasmochin, Atebrin u. a. handelt, als unhaltbar abgelehnt. Das Primäre ist hier stets die Beeinflussung des Erregers durch das Chemikale; die Reaktionserscheinungen seitens des Retikuloendothels und die sonstigen Abwehrmaßnahmen des infizierten Organismus sind dagegen, wie schon vorher ausgeführt wurde, als ausgesprochen sekundäre Vorgänge zu betrachten.

Was nun die bei bakteriellen Erkrankungen mit gewissem Erfolg verwendeten Präparate, speziell die bei Tuberkulose anscheinend vielfach gut brauchbaren Goldverbindungen anlangt, so habe ich bisher mangels überzeugender Beweise nur von der Möglichkeit einer direkten Beeinflussung der Erreger gesprochen, bin aber schon damit besonders bei den Tuberkuloseärzten (Schröder, Bacmeister u. a.) auf Widerspruch gestoßen. Durch die neuen Erkenntnisse z. B. hinsichtlich der Heilwirkung von Wismut- und Quecksilberverbindungen bei der Syphilis, vor allem aber durch die mit den Sulfonamidverbindungen, erhobenen Befunde (Domagk, Levaditi, Levaditi u. Vaisman, Colebrook u. Kenny, Colebrook, Buttle u. O'Meara, Gay u. Clark, Bürgers, Tréfouel u. Mitarbeiter, Felke, Soehring, Wezel, Mellon, Gross u. Cooper u. a.) bin ich jedoch immer mehr zu der Ueberzeugung gelangt, daß gerade die therapeutische Wirkung der Goldpräparate bei Tuberkulose oder diejenige des Chaulmoograöls und seiner Derivate bei Lepra in erster Linie ebenfalls durch eine direkte Beeinflussung der Erreger zustande kommt.

Es ist im Rahmen dieses Referats nicht möglich, hier auf alle Einzelheiten, welche mir in diesem Sinne zu sprechen scheinen, ausführlich einzugehen; vielmehr muß ich mich darauf beschränken, einen kurzen Ueberblick über die ganze Situation zu geben. Zum Verständnis der Verhältnisse muß man sich m. E. zunächst von der noch weit verbreiteten irrigen Vorstellung frei machen. daß Chemotherapie und Therapia sterilisans magna identische Begriffe seien. So kann ich man sich wohl kaum vorstellen, daß die in vitro nur schwer beeinflußbaren Tuberkelbazillen durch ein chemisches Mittel im Organismus abgetötet werden. Dagegen kann man sich sehr wohl vorstellen, daß sich auf diese Weise eine Entwicklungshemmung dieser Mikroben erreichen läßt. Gewiß ist es das erstrebenswerte Ziel der Chemotherapie, den an einer Infektionskrankheit leidenden Menschen mit einem Schlage von seinen Krankheitserregern zu befreien. Wir sind davon aber noch sehr weit entfernt, und selbst bei denjenigen chemischen Heilmitteln, die sich durch hohe Spezifität und starke Wirksamkeit auszeichnen, ist zur Erzielung einer Heilung fast stets eine mehrmalige oder gar längere Behandlung nötig. Der Grund hierfür ergibt sich aus den obigen Darlegungen, nach denen die Chemotherapie im allgemeinen nicht zu einer Abtötung, sondern nur zu einer Schädigung und Entwicklungshemmung der betreffenden Erreger führt. Damit ist aber naturgemäß noch keine Heilung der Erkrankung erreicht. Vielmehr ist hierzu, wie dies bereits kurz dargelegt wurde, die Mitwirkung des Organismus erforderlich. Nur wenn dieser auf die Infektion mit ausreichenden spezifischen Abwehrmaßnahmen antwortet, kann eine Ausheilung der Erkrankung erwartet werden; bleibt die Mitwirkung des Körpers aus, so kommt es später nach Wegfall der wachstumshemmenden Wirkung wieder zu einer Vermehrung der Erreger und damit zum Weiterschreiten der Infektion. Dadurch wird es verständlich, daß z. B. bei Tieren, deren Retikuloendothel irgendwie ausgeschaltet ist, die Heilwirkung bestimmter Chemotherapeutika herabgesetzt wird (Feldt, Kritschewski, Jungeblut, v. Jancsó u. a.) oder das Germanin zwar die Trypanosomenerkrankungen bei Mensch und Tieren heilen, aber mit Trypanosomen infizierte Zwischenwirte (Glossinen, Blutegel; Duke, Brumpt), bei denen die Infektion keine Abwehrreaktion auslöst, nicht sterilisieren kann, oder daß der Akridinfarbstoff Rivanol Staphylokokken zwar im lebenden, nicht aber im toten Mäuseorganismus und auch nicht im lebenden Frosch, der auf die Staphylokokkeninfektion nicht reagiert, zu beeinflussen vermag (Nodake). Auch die neuerdings von Collier u. Verhoog experimentell demonstrierte Abhängigkeit

des chemotherapeutischen Heileffekts von der Infektionsdose deutet in diesem Sinne. Schließlich ist es bei dieser Betrachtungsweise auch ohne weiteres einzusehen, daß bei chronischen Infektionskrankheiten, die durch ein Darniederliegen der aktiven Immunitätsvorgänge gekennzeichnet sind, zur Erzielung eines Heileffektes unter Umständen eine recht lange Behandlung notwendig sein kann oder daß bei einem durch die Infektion schon zu sehr geschwächten und dadurch anergischen Organismus die Chemotherapie überhaupt versagt.

Für die Beurteilung der Wirkungsweise der genannten Präparate bei bakteriellen Infektionen ist weiterhin die Tatsache von Wichtigkeit, daß diese Substanzen im Reagenzglasversuch auf die betreffenden Erreger in ziemlich elektiver Weise und noch in außerordentlich starker Verdünnung entwicklungshemmend wirken. Schon Robert Koch hat diese Wirkung für die Goldverbindungen gegenüber Tuberkelbazillen hervorgehoben; später wurden ähnliche Befunde von Morgenroth hinsichtlich der Chininderivate besonders gegenüber Pneumokokken und Streptokokken, von Walker u. Sweeney u. a. hinsichtlich des Chaulmoograöls gegenüber säurefesten Bakterien, von Kolle und Schlossberger für die Arsenobenzolderivate gegenüber Schweinerotlaufbazillen festgestellt. Da nun aber weiterhin für die bei Tuberkulose wirksamen Goldpräparate mit Sicherheit (Koppenhöfer, Schröder u. a.), für das Chaulmoograöl und seine Derivate mit ziemlicher Wahrscheinlichkeit (Read, Nolasco) nachgewiesen ist, daß sie im erkrankten Organismus vorzugsweise im Bereich der Krankheitsprodukte, d. h. der Tuberkel und der Leprome zur Ablagerung kommen, erscheint m. E. die Möglichkeit durchaus gegeben, daß besonders bei längerer Behandlung in dem pathologischen Gewebe Konzentrationen erreicht werden, die zu einer Schädigung der Mikroben ausreichen. Zutreffendenfalls könnte man sich m. E. sehr wohl vorstellen, daß bei genügend lange anhaltender Beeinträchtigung der Erreger durch das Heilmittel der erkrankte Organismus, soweit er überhaupt noch die nötige Reaktionsfähigkeit besitzt, das Uebergewicht über die Infektion gewinnt und daß dadurch der Prozeß zum Stillstand kommt. Was die Wirkungsweise der Chininderivate, insbesondere des Aethylhydrocupreins (Optochins) bei der Pneumokokkeninfektion und der Arsenobenzolderivate beim Schweinerotlauf anlangt, so dürfte hier an einer direkten Beeinflussung der Erreger wohl kaum zu zweifeln sein; erwähnt sei hier nur, daß es Morgenroth und seinen Mitarbeitern, Jungeblut u. a. gelungen ist, Pneumokokken gegen das Aethylhydrocuprein zu festigen.

Nur ganz kurz sei noch betont, daß die hier entwickelten Ueberlegungen und die daraus gezogenen Schlußfolgerungen auch mit den klinischen Ergebnissen in guter Uebereinstimmung stehen. Es läßt sich auf diese Weise nicht nur das Zustandekommen des Heileffektes, sondern auch die Tatsache einigermaßen verständlich machen, daß sich mit diesen verhältnismäßig wenig wirksamen Substanzen Heileffekte lediglich bei bestimmten Erkrankungsfällen und auch nur bei genügend lange fortgesetzter Behandlung erzielen und aufrechterhalten lassen. Vor allem wird es so auch verständlich, daß die Heilwirkungen, welche bei Tuberkulose- und Lepraerkrankungen mit Gold- bzw. Chaulmoograderivaten erreicht werden, zunächst nur in einem Anhalten des Krankheitsprozesses, niemals in einer Sterilisierung des Organismus bestehen und daß der weitere Verlauf der Infektion weitgehend vom Verhalten des Organismus, d. h. davon abhängt, ob dieser mit den in ihrer Vitalität lädierten Erregern einigermaßen fertig wird. Es kann also auch gar nicht wundernehmen, daß z. B. bei Leprakranken trotz gründlicher Behandlung mit Chaulmoograöl und Verschwindens der Krankheitserscheinungen noch Lepra-

bazillen in den tieferen Hautschichten färberisch nachzuweisen sind und daß bei solchen Patienten dann, wenn die Therapie auch nach klinischer Heilung nicht genügend lange fortgesetzt wird, nach einiger Zeit wieder Rückfälle auftreten.

Weiter ist daraus aber auch noch zu entnehmen, daß zur Verbesserung der Heileffekte bei diesen chronischen Erkrankungen, wie Tuberkulose und Lepra, die Auffindung stärker wirksamer ätiotroper Heilmittel nur dann genügen dürfte, wenn dieselben imstande wären, sämtliche im Organismus vorhandenen Erreger abzutöten. Da aber diese Möglichkeit, wie bereits angedeutet, außerordentlich unwahrscheinlich ist und sich kaum verwirklichen lassen dürfte, muß bei den genannten und ähnlichen Krankheiten das Bestreben dahin gehen, außer einer vollständigen Hemmung des Erregerwachstums auch noch eine Verstärkung der unzureichenden aktiven Abwehrmaßnahmen des Organismus zu erreichen. Es sei bei dieser Gelegenheit daran erinnert, daß die im 16. Jahrhundert übliche Behandlung der Syphilis mit Quecksilber und Schwitzkuren im Grunde genommen nichts anderes als eine Kombination der ätiologischen Behandlung mit einer durch die Erhöhung der Körpertemperatur und dadurch auch der Stoffwechselvorgänge bedingten Steigerung der spezifischen Abwehrmaßnahmen des Organismus darstellte (vgl. auch Simpson, Bessemans). Dasselbe ist auch der Fall, wenn heutzutage die Tuberkulose- und Lepraärzte bei der Gold- bzw. Chaulmoogratherapie außerdem noch ganz besonderen Wert auf die Stärkung der Körperkräfte ihrer Patienten legen. Es handelt sich hier um Probleme, die ich nur andeuten möchte, auf die ich aber des näheren nicht eingehen kann.

Wenn ich zum Schluß meiner Darlegungen noch einmal kurz zusammenfassen darf, so kann ich meinen Standpunkt dahin präzisieren, daß ebenso wie bei Spirochäten- und Protozoenkrankheiten auch bei den durch bakterielle Erreger hervorgerufenen Erkrankungen die Herbeiführung einer Heilung auf chemotherapeutischem Wege, d. h. durch direkte Beeinflussung der Mikroben mittels spezifisch eingestellter chemischer Substanzen möglich erscheint. Auf Grund der vorliegenden experimentellen und klinischen Feststellungen ist anzunehmen, daß es sich auch bei der chemotherapeutischen Heilung bakterieller Infektionskrankheiten um einen komplexen Vorgang handelt, der in einer primären Schädigung der Parasiten durch das Chemikale und in einem erst dadurch möglichen, also sekundären Einsatz der natürlichen Abwehrmaßnahmen des Organismus besteht. Man hat sich also vorzustellen, daß der infizierte Körper durch diese auf chemischem Wege bewirkte Schwächung der Erreger in den Stand gesetzt wird, mit der Infektion fertig zu werden. Die Mitwirkung des Organismus ist daher unbedingte Voraussetzung für das Zustandekommen der Heilung. Ist die Abwehrreaktion des Körpers nur ungenügend oder ist er überhaupt nicht oder nicht mehr imstande, auf die Infektion in spezifischer Weise zu reagieren, so hat die Anwendung der größtenteils nur entwicklungshemmend wirkenden Chemotherapeutika lediglich eine vorübergehende Wirkung. Bei solchen chronischen Erkrankungen, die, wie die Tuberkulose oder die Lepra durch ein besonderes Daniederliegen der aktiven Immunitätsvorgänge gekennzeichnet sind, muß es das Bestreben sein, außer einer durch das Chemotherapeutikum zu erreichenden Entwicklungshemmung der Erreger auch noch eine Steigerung der Abwehrmaßnahmen des Organismus herbeizuführen.

Schrifttum.

Bacmeister, A., Beitr. Klin. Tbk. **89**, 629 (1937). — Bessemans, J. F. A. A., Brit. J. vener. Dis. **14**, 71 (1938). — Bettmann u. Laubenheimer, Dtsch. med. Wschr. **38**, 349 u. 1397 (1912). — Bierbaum, K., Dtsch. med. Wschr. **38**, 2012 (1912). — Ders., Paul

Ehrlich-Festschrift, S. 617. Jena, G. Fischer, 1914. — Ders., Z. Immun.forschg 26, 325 (1917). — Brumpt, E., Rev. méd. de Angola 3, 131 (1923). — Burgers, Dtsch. med. Wschr. 63, 672 (1937); 64, 598 (1938). — Christison, M. H., Zbl. Bakter. I Orig. 131, 193 (1934). — Colebrook, L., Buttle, G. A. H., u. O'Meara, R. A. Q., Lancet 1936 II, 1323. — Colebrook, L., u. Kenny, M., Lancet 1936 I, 1279. — Collier, W. A., u. Verhoog, M. J., Acta brevia Neerland. 6, Nr 9/10 (1936). — Doerr, R., u. Hallauer, C., Z. Immun.forschg 47, 291 (1926). — Domagk, G., Dtsch. med. Wschr. 61, 250 (1935). — Ders., Klin. Wschr. 15, 1585 (1936); 16, 1412 (1937). — Ders., Z. kin. Med. 132, 775 (1937). — Duke, H. L., Interim Report of the League of Nations internat. Commission on human trypanosomiasis. C. H. 536, Genf 1927, p. 23 u. 35. — Ehrlich, P., Z. ärztl. Fortbildg 6, 721 (1909). —Ders., Z. angew. Chem. 23, 2 (1910). — Ders., Zbl. Bakter. I Ref. 50, Beih., 94 (1911). — Eisler, M., Z. Immun.forschg 73, 37 (1931). — Ders., u. Howard, A., Z. Immun.forschg 76, 461 (1932). — Feldt, A., Klin. Wschr. 6, 1136 (1927); 7, 73 (1928). — Ders., Beitr. Klin. Tbk. 89, 649 (1937). — Ders., Schoeller, W., Borgwardt, E., u. Allardt, H., Med. Welt 4, 390 u. 437 (1930). — Ders., u. Schott, A., Z. Hyg. 107, 453 (1927). — Felke, H., Klin. Wschr. 17, 13 (1938). — Ders., Arch. f. Dermat. 178, 152 (1938). — Fracastorius, Hieronymus, Drei Bücher von den Kontagien, den kontagiösen Krankheiten und deren Behandlung (1546). Uebersetzt von V. Fossel. Klassiker der Medizin, Bd. 5. Leipzig, J. A. Barth, 1910. — Gay, F. P., u. Clark, A. R., J. of exper. Med. 66, 535 (1937). — Hoagland, Ch. L., Beeson, P. B., u. Goebel, W. F., Science (N. Y.) 88, 261 (1938). — Hörlein, H., Proc. roy. Soc. Med. 29, 313 (1935). — v. Jancsó, N., Ber. Physiol. 108, 679 (1938). — Ders., Zbl. Bakter. I Orig. 132, 257 (1934). — Ders., u. v. Jancsó, H., Z. Immun.forschg 84, 471 (1935). — Jijima, T., Scientif. Rep. Government Institut infect. Dis. Tokyo Imper. University 1, 97 (1922). — Ders., J. of Path. 26, 519 (1923). — Jungeblut, C. W., Z. Hyg. 99, 254 (1923); 107, 357 (1927). — Ders., J. inf. Dis. 41, 345 (1927). — Kendall, F. E., Heidelberger, M., u. Dawson, M. H., J. of biol. Chem. 118, 61 (1937). — Koch, R., Mitt. ksl. Gesdh.amt 1, 234 (1881). — Ders., Dtsch. med. Wschr. 16, 756 (1890). — Kolle, W., Leupold, F., Schlossberger, H., u. Hundeshagen, K., Arb. Inst. exper. Ther. Frankfurt 14, 45 (1921). — Ders., u. Schlossberger, H., Münch. med. Wschr. 68, 1439 (1921). — Koppenhöfer, G. F., Beitr. Klin. Tbk. 86, 549 (1935). — Ders., Dtsch. med. Wschr. 62, 1011 (1936). — Kritschewski, J. L., Zbl. Bakter. I Orig. 104, 214 (1927). — Ders., Wien. klin. Wschr. 40, 1504 (1927). — Ders., Z. Immun.forschg 53, 506 (1927); 55 107 (1928); 59, 1 (1928). — Landsteiner, K., u. Levine, P., J. of Immun. 22, 75 (1932). — Levaditi, C., Le mode d'action des dérivés benzéniques sulfurés dans les infections microbiennes expérimentales. Monographies de l'Institut Alfred Fournier (Paris) Nr 5 (1937). — Ders., Schweiz. Z. f. Allg. Pathol. u. Bakt. 1, 365 (1938). — Ders. u. Vaisman, A., Presse méd. 43 2097 (1935). — v. Linden, Gräfin, Experimentalforschungen zur Chemotherapie der Tuberkulose mit Kupfer- u. Methylenblausalzen. Leipzig, C. Kabitzsch, 1920. — Lockwood, J. S., J. of Immun. 35, 155 (1938). — Mellon, R. R., Gross, P., u. Cooper, F. B., Sulfanilamide therapy of bacterial infections. Springfield Jll. u. Baltimore Md., Ch. C. Thomas Publ., 1938. — Meyer, K., u. Palmer, J. W., J. of biol. Chem. 114, 689 (1936). — Møllgaard, H., Chemotherapy of Tuberculosis. Kjöbenhavn: Nyt Nordisk Forlag, 1924. — Ders., J. amer. med. Assoc. 83, 1928 (1924). — Ders., Brit. med. J. 1925 I, 643. — Ders., Ueber die experimentellen Grundlagen für die Sanocrysinbehandlung der Tuberkulose. Tuberk.-Bibl. Nr 20, S. 1. Leipzig, J. A. Barth, 1925. — Ders., Acta tbc. scand. (Köbenh.) 2, 195 (1926); 3, 337 (1928). — Ders., Z. Tbk. 45, 120 (1926). — Morgenroth, J., Berl. klin. Wschr. 51, 1829 u. 1865 (1914). — Nodake, R., Zbl. Bakter. I Orig. 95, 289 (1925). — Nolasco, J. O., Philippine Isl. med. Assoc. 11, 219 (1931); 12, 147 (1932); 13, 552 (1933). — Ders., Trans. far eastern Assoc. trop. Med. 8th Congr. Bangkok 1930, 2, 612 (1932). — Read, B. E., China med. J. 39, 605 (1925). — Schiemann, O., u. Feldt, A., Z. Hyg. 106, 83 (1926). — Schlossberger, H., New York med. J. 115, 26 (1922). — Ders., Klin. Wschr. 16, 73 (1937). — Ders., 2. Internat. Kongreß f. Mikrobiologie, London 1936, Report of Proceedings, p. 287 (London 1937). — Ders., Beitr. Klin. Tbk. 89, 614 (1937). — Ders., Angew. Chem. 50, 407 (1937). — Ders., Orv. Hetil. (ung.) 82, 281 (1938). — Ders., Umschau 42, 931 (1938). — Ders., Zbl. Bakter. I Ref. 130, 447 (1938). — Ders., Chaulmoograöl. Berlin, J. Springer, 1938. — Ders., u. Bär, F., Zbl. Bakter. I Orig. 144, 228* (1939). — Schnabel, A., Biochem. Z. 108, 258 (1920); 122, 295 (1921). — Schnitzer, R., Medizin u. Chemie (I.G.Farbenindustrie A.G.) 1, 85 (1931); 3, 34 (1936). — Schröder, G., Beitr. Klin. Tbk. 86, 557 (1935); 89, 714 (1937). — Ders., Wiss. Woche Frankfurt a. M. 3, 205 (1935). — Schuster, G., Münch. med. Wschr. 59, 349 (1912). — Siegmund, H., Dtsch. med. Wschr. 63, 1897 (1937). — Ders., Beitr. Klin. Tbk. 89, 605 (1937). — Simpson, W. M., J. amer. med. Assoc. 105, 2132 (1935). — Ders., Brit. J. vener. Dis. 12, 133 (1936). — Ders., Wien. klin. Wschr. 49, 779 u. 817 (1936). — Ders., u. Kendell, H. W., Amer. J. Syph. 21, 526 (1937). — Soehring, K., Biochem. Z. 295, 265 (1938). — Sydenham, Thomas, Opera universa medica. Hrsg. von Gottl. Kühn, Leipzig, Voß, 1827. — Tréfouel, J., Tréfouel, Mme J., Nitti, F., u. Bovet, D., Presse

méd. **45**, 839 (1937). — Walker, E. L., u. Sweeney, M. A., J. inf. Dis. **26**, 238 (1920). — Wezel, H., Z. Immun.forschg **92**, 496 (1938). — Ders., Münch. med. Wschr. **85**, 1897 (1938). — Witebsky, E., Neter, E., u. Sobotka, H., J. of exper. Med. **61**, 703 (1935). — Wohlfeil, T., Zbl. Bakter. I Orig. **122**, Beih., 88 (1931). — Ders., Z. Hyg. **119**, 119 (1936). — Ders., Zbl. Bakter. I Orig. **139**, 417 (1937). — Ders., Klin. Wschr. **16**, 1369 (1937). — Ders., u. Becker, H., Zbl. Bakter. I Orig. **142**, 439 (1938). — Ders., u. Wollenberg, H., Ebenda **141**, 159 (1938).

Sammelbericht VI: Gerhard Domagk (Wuppertal-Elberfeld)[1]):

Die Chemotherapie der bakteriellen Infektionen mit Prontosil und seinen Derivaten, unter besonderer Berücksichtigung der Grenzen dieser Therapie [2]).

Die Ueberzeugung, daß es eine Möglichkeit geben müßte, auch die bakteriellen Infektionen wirksam zu bekämpfen, tauchte zum erstenmal 1923/24 auf, als wir Untersuchungen über die Bedeutung des Retikuloendothels für die Vernichtung von Infektionserregern durchführten. Die Beobachtung der abnormen natürlichen Abwehrkräfte, mit denen ein Organismus ihm künstlich injizierte Keime beseitigen kann, legte den Gedanken nahe, daß es gar nicht notwendig sei, die Bakterien völlig im Körper abzutöten; es kam nur darauf an, den Körper zweckmäßig in seinen natürlichen Abwehrbestrebungen zu unterstützen, entweder dadurch, daß man die Keime so weit schädigte, daß sie für den Makroorganismus angreifbar oder in ihrer Entwicklung gehemmt wurden, oder aber, indem man die natürlichen Abwehrbestrebungen des erkrankten Körpers stärkte, auf keinen Fall aber nachteilig beeinflußte. Die ersten Versuche, die dahin gingen, aus dem RES wirksame Substanzen zu isolieren, schlugen fehl, weiterhin auch solche Versuche, die im Desinfektionsversuch hochwirksamen Substanzen wie Akridine, Phenolderivate, die von uns entdeckten hochwirksamen Amine und quaternären Ammoniumverbindungen für chemotherapeutische Zwecke zu verwenden. Nach jahrelangen vergeblichen Versuchen gelang es mir schließlich im Jahre 1932 an gewissen von Klarer und Mietzsch synthetisierten sulfonamidhaltigen Azo-Verbindungen eine bisher in diesem Ausmaß unbekannte chemotherapeutische Wirkung bei der experimentellen Streptokokkeninfektion bei Mäusen und Kaninchen aufzufinden. 3 Jahre lang wurde eine sorgfältige klinische Prüfung der damals von uns aufgefundenen und anfangs als „Streptozon" bezeichneten Substanz, die sich pharmakologisch als weitgehend indifferent erwiesen hatte, durchgeführt.

1935 brachte ich dann gleichzeitig mit den von bedeutenden Klinikern erzielten Prüfungsergebnissen auch die erste Mitteilung über die experimentellen Grundlagen dieser neuen Therapie. Dieses Abwarten bis zur Sicherung klinischer Ergebnisse ist von einigen Seiten als unverständlich und mysteriös bezeichnet worden. Unseres Erachtens kam aber alles darauf an, bei der

---

1) Aus der Abteilung für experimentelle Pathologie und Bakteriologie der I.G.Farbenindustrie Wuppertal-Elberfeld.

2) Der erste Teil des auf der 18. Tagung der deutschen Vereinigung für Mikrobiologie in Wien gehaltenen Vortrages erscheint demnächst ausführlich in der Zeitschrift für klinische Medizin; dort auch ausführliche Literatur.

grundsätzlichen Bedeutung des erzielten Erfolges im Experiment nun nicht durch eine vorzeitige Veröffentlichung falsche Hoffnungen bei Aerzten und Patienten zu erwecken.

Die im Frühjahr 1935 veröffentlichten experimentellen klinischen Ergebnisse über die neuen Möglichkeiten einer Therapie der bakteriellen Infektionen fanden sowohl in Deutschland als auch in allen übrigen großen Kulturländern einen großen Widerhall. Als einer der ersten nahm Levaditi am Pasteur-Institut in Paris eingehende Nachprüfungen der von uns erzielten experimentellen Ergebnisse an 12 verschiedenen Streptokokkenstämmen vor und bestätigte schon Ende 1935 die von uns erhobenen Befunde und brachte weitere wichtige Ergänzungen. In Deutschland erschienen experimentelle Nachprüfungen aus den Hygienischen Instituten der Universitäten Münster, Marburg und Königsberg. Ueber die zahlreichen in Königsberg unter der Leitung von Bürgers in den Jahren 1935—1937 durchgeführten Untersuchungen erschien 1937 ein zusammenfassender Bericht von Bürgers selbst. Im Laufe des Jahres 1936 wurden auch von englischen Autoren Nachprüfungen unserer eigenen und inzwischen von französischen Forschern erschienener Arbeiten vorgenommen. Diesen Veröffentlichungen folgten im Jahre 1936 und 1937 auch zahlreiche amerikanische Arbeiten auf diesem Gebiet. Kaum ein anderes neues Arzneimittel hat in den letzten Jahren und in so kurzer Zeit ein solches Interesse gefunden wie die sulfonamidhaltigen Verbindungen, von denen die ersten unter den Namen Prontosil Eingang in die allgemeine ärztliche Praxis fanden. Daß man neuen Arzneimitteln, die eine chemotherapeutische Wirkung gegenüber bakteriellen Infektionen für sich beanspruchten, zunächst mit der größten Skepsis entgegentrat, ist verständlich. Denn wie oft waren die Hoffnungen der Aerzte auf ein solches Mittel enttäuscht worden. Viele Forscher und Kliniker hatten sich bereits einer vollkommen resignierten Einstellung hingegeben. Daß es jedoch auch die Möglichkeit geben konnte, die Entwicklung der Krankheit bis zu den bedenklichen Phasen der allgemeinen Sepsis zu verhindern, wurde meist gar nicht genügend in Betracht gezogen. Um dieses Ziel zu erreichen, blieb meines Erachtens nur der einzige Weg, zunächst im Experiment klare, gesicherte Unterlagen zu schaffen.

Besonders auffallend war es, als wir in unseren Versuchen wirksame sulfonamidhaltige Azoverbindungen auffanden, die im üblichen Desinfektionsversuch so gut wie keine Wirkung erkennen ließen. Aehnliche Verbindungen waren 20 Jahre vorher von Hörlein und Mitarbeitern synthetisiert worden, ohne daß zu dieser Zeit jemand an ihre therapeutische Verwendungsmöglichkeit dachte. Aus diesem Verbindungstypus heraus entwickelten wir die im Tierversuch optimal wirksam gefundenen Prontosile.

Das Prontosil rubrum $H_2NO_2S\langle\;\rangle N = N\langle\;\rangle NH_2$ (mit NH_2 am zweiten Ring)

war ein basischer Azofarbstoff; das wesentlich besser lösliche Prontosil solubile

$$H_2NO_2S\langle\;\rangle N = N \text{ — Naphthalinring (OH; } NHCOCH_3\text{; } NaO_3S\text{, } SO_3Na)$$

war ein saurer Farbstoff und auch bei intravenöser und intramuskulärer Injektion gut wirksam. Sowohl bei den Azoverbindungen als auch bei dem Ausgangsprodukt dieser Substanzen, dem p-Aminophenylsulfonamid, auf dessen Wirkung in der Literatur zuerst von Tréfouel, Nitti und Bovet aufmerksam gemacht wurde, stellte sich bald eine Reihe von Gesetzmäßigkeiten heraus,

die zur Auffindung zahlreicher neuer wirksamer Verbindungen führte, ohne daß die Wirkung der genannten Substanzen bisher wesentlich übertroffen werden konnte. Scheinbar besser wirksame Substanzen besaßen vermehrt Nebenwirkungen oder auch andere Nachteile. Wirksam waren alle Verbindungen, in denen die Sulfonamidgruppe in Parastellung zur Azo- oder NH_2-Gruppe stand. Eine Verschiebung der Azo-Gruppe resp. NH_2-Gruppe sowie zahlreiche andere chemische Veränderungen am Molekül hatten eine starke Abnahme der chemotherapeutischen Wirkung oder gar ihr Verschwinden zur Folge. In der Sulfonamid-Gruppe war eine teilweise oder völlige Substitution der Wasserstoffe möglich. Diese Beobachtungen führten Mietzsch und Klarer zur Synthese von weiteren Sulfonamid-Derivaten aus der Benzol-, Naphtalin-, Chinolin-, Akridin-Reihe, zu Sulfonamid-Verbindungen des Diphenyläthers, des Diphenylamins, der Azomethin-Verbindungen u. a. m. Darüber hinaus zeigte sich, daß auch Verbindungen mit anderen Oxydationsstufen des Schwefels antibakterielle Wirkungen besitzen; an Stelle der Azo, NH_2, Azetylamino-Gruppe konnte auch die Nitrogruppe sowie andere stickstoffhaltige Gruppen stehen.

Die mit diesen Verbindungen erzielbare chemotherapeutische Wirkung wurde zuerst an Streptokokken-infizierten Mäusen und Kaninchen erkannt. Zum Teil waren noch Dosen von $^1/_{100}$ der Dosis tolerata wirksam, in seltenen Fällen noch kleinere Dosen. Die besten Ergebnisse wurden bei mehrmals im Abstand von 6—8 Std. dargereichten Dosen erzielt, und zwar sowohl bei oraler als auch bei parenteraler Darreichung.

Ueber den Wirkungsmechanismus der neuen therapeutischen Mittel sind die Ansichten noch geteilt. Nach unseren experimentellen Ergebnissen dürfte die erste Phase stets in einem direkten Angriff auf die Keime zu sehen sein, aber nur selten werden die Bakterien völlig abgetötet, sondern nur so weit verändert, daß sie durch die natürlichen Abwehrkräfte des Körpers einer völligen Vernichtung zugänglich gemacht werden; z. B. verhalten sich nach der Behandlung mit Prontosil die virulenten Streptokokken wie avirulente und werden von den Phagozyten, Leukozyten und Monozyten angegriffen. Während z. B. bei unbehandelten Tieren die intramuskuläre Infektion mit hämolytischen Streptokokken zur Ausbildung einer fortschreitenden Phlegmone mit auffallend geringer zellulärer Abwehr führt, wandern in den Stichkanal bei Prontosil-behandelten Tieren sehr rasch Leukozyten ein und führen zu einer Vernichtung der Kokken und zur Abgrenzung des Entzündungsprozesses.

Es ist wahrscheinlich, daß bei manchen der am lebenden Tier gut wirksamen Substanzen die wirksamen Komponenten erst im Tierkörper entstehen, vielleicht sogar nur in den Entzündungszellen oder gar an den Bakterien, wenn sie sich unter optimalen Lebensbedingungen im tierischen oder menschlichen Organismus befinden. Dadurch würde sich vielleicht auch die besondere spezifische Wirkung gerade einiger in vitro fast unwirksamer Substanzen erklären, bei denen der größte Teil den Makroorganismus wieder unverändert, hauptsächlich im Harn verläßt. Für die Ansicht von der Entstehung besonders wirksamer Substanzen im Tierkörper, resp. seine entscheidende Mitwirkung sprechen eine Reihe von Beobachtungen.

1. Stundenlang mit Prontosil in vitro vorbehandelte Streptokokken führten doch oft noch zur Infektion, selbst wenn Prontosil in Konzentrationen angewendet wurde, wie sie im Blut oder in den Geweben des Organismus niemals auftreten können. Auch Kokken, die stundenlang mit p-Aminophenylsulfonamid, das einige Autoren als die allein wirksame Substanz ansehen, behandelt wurden, und zwar auch mit Konzentrationen, wie sie im Organis-

mus unvorstellbar sind, führen trotzdem zur Ausbildung einer Phlegmone, wenn nicht eine zunächst fortlaufende subkutane oder orale Weiterbehandlung einsetzt.

2. Bei intraperitoneal infizierten Tieren wirkte die intraperitoneale Zuführung von Prontosil nicht besser, meist schlechter als die intramuskuläre, subkutane oder orale Verabreichung (vgl. auch Levaditi).

3. Das Auftreten von Degenerationsformen der Kokken ist nur in vivo sehr ausgesprochen, niemals im selben Ausmaß auch in vitro.

4. Bei intramuskulär infizierten, subkutan behandelten Tieren sieht man zunächst eine Vermehrung der Keime, bis dann, meist 6—8 Std. nach der Infektion, ihr Verschwinden einsetzt.

5. Bedenkt man schließlich, daß der Ausgangspunkt unserer Untersuchungen in vitro wirksame Azo-Verbindungen mit langem basischem Rest waren, so muß man erwägen, ob nicht ähnliche Verbindungen im Organismus aus den in vitro schwach oder ganz unwirksamen Substanzen entstehen könnten.

Erwähnen möchte ich noch, daß eine Konzentration von 1:10000 Prontosil in der Gewebskultur keine Hemmungswirkung auf das Wachstum von Leukozyten ausübt. Diese Versuche wurden von uns an Meerschweinchen-Leukozytenkulturen durchgeführt.

Lookwood gibt an, daß Peptonkulturen von Streptokokken in defibriniertem Blut nicht vernichtet werden, hingegen Streptokokken, die ohne Pepton gewachsen sind. Wir selbst konnten bisher diese Ansicht noch nicht bestätigen. Nach einer anderen Theorie sollen Streptokokken Peroxid bilden und daran zugrunde gehen, weil unter Prontosilwirkung die Katalase nicht wirken soll. Ich hege jedoch Zweifel, ob diese Ansicht in dieser Form zu Recht besteht, weil in vivo die Peroxide ja auch nicht weggeschafft wird und trotzdem diese Wirkung nicht deutlich ist. Außerdem tritt die Wirkung bei in vivo subkutan behandelten Tieren ja schon in wenigen Stunden auf. Ein besonderes Interesse und weitere Bearbeitung verdient m. E. die Ansicht, daß die Kokken durch die genannten wirksamen Verbindungen in ihrer Toxinbildung gehemmt werden. Dafür scheint mir die mehrfach von uns gemachte Beobachtung zu sprechen, daß in Blutplattenkulturen bei sehr stark hämolysierenden Stämmen keine Hämolyse, beispielsweise in Gegenwart von Uliron oder Diseptal C eintrat, obwohl noch lebende Kokken durch Abimpfung nachweisbar waren. Von einigen Autoren wird sogar angenommen, daß die Prontosile und ihre Derivate teilweise die Toxine selbst angreifen oder abbinden. Ueber die Feinheiten dieser Vorgänge werden aber erst weitere Arbeiten endgültige Aufklärung bringen können.

Ueber den Wert der Einzelvorgänge bei dem Ablauf dieses Geschehens im infizierten Tier kann man noch streiten. Ob der primären Veränderung durch die Substanz selbst oder einem Umwandlungsprodukt eine größere oder kleinere Bedeutung zukommt, oder ob der nachfolgenden Phagozytose oder auch extrazellulären Vorgängen die größere Bedeutung beizumessen ist oder die Abbindung der Toxine oder die Verhinderung ihrer Bildung entscheidenden Einfluß hat, über all diese Dinge wird man noch viel diskutieren, ehe sie restlos geklärt sind. Aber über eines läßt sich nicht mehr diskutieren: daß diese Substanzen in der Lage sind, tödliche Infektionen bei Tier und Mensch auszuheilen.

In der Klinik bewährten sich die geprüften Verbindungen bei der Puerperalsepsis, dem Erysipel sowie vielen Hals- und Gelenkentzündungen. Es gelang, die schweren Komplikationen dieser Erkrankungen zu verhindern, sie zu rascher Abheilung zu bringen und die Sterblichkeit an diesen schweren

Erkrankungen erheblich herabzumindern. So gelang es beispielsweise englischen Autoren, bei schweren Erkrankungen des Kindbettfiebers durch große Dosen — bis zu 12 Tabletten à 0,3 g Prontosil täglich und im Abstand von 8 Std. wiederholte Injektionen von 10—20 ccm der 2,5proz. Prontosil solubile-Lösung — die Sterblichkeit von über 20 Proz. auf ca. 4 Proz. herabzudrücken; anderen Autoren gelang es, mit ähnliche hohen Dosierungen von 16 Proz. Mortalität auf 1 Proz. herabzukommen. Welche große Rolle diese Infektionen auch heute noch in Deutschland spielen, geht aus einer von Reiner-Müller veröffentlichten Zusammenstellung für Deutschland hervor. Aehnliche Verhältnisse gelten auch für andere Länder.

1934	nach rechtz. Geburt 3765 (784 +);	nach Fehlgeburt	2124 (723 +)
1935	„ „ „ 4136 (842 +);	„ „	2685 (581 +)
1936	„ „ „ 3936 (780 +);	„ „	3304 (551 +)
1937	„ „ „ 3402 (671 +);	„ „	3015 (438 +).

Ob die in den letzten Jahren feststellbare Abnahme der Gesamtmortalität schon eine Folge der Prontosil-Darreichung ist, bleibe noch dahingestellt. Sie wird sich durch rechtzeitige Verabreichung der notwendigen Dosen sicherlich weiter herabsetzen lassen. Auch in England macht sich seit der Einführung des Prontosils bereits eine Abnahme der Gesamtmortalität an dieser schweren Erkrankung bemerkbar. Engelmann und Schüler empfehlen rektale Einläufe einer Aufschwemmung von 10—20 Tabletten Prontosil rubrum à 0,3 g nach einem vorherigen Reinigungseinlauf. Auch Dolff rät bei Puerperalsepsis zu hohen Dosen von mindestens 4 g pro die.

Bei Erysipel kommt man in der Regel mit wenigen kleineren Dosen und auch meist mit nur oraler Darreichung von Tabletten aus, z. B. 3mal täglich 2 Tabletten à 0,3 g.

Bei Anginen scheint am zweckmäßigsten zu sein, die Tabletten im Munde zergehen zu lassen, weil dann ein großer Teil der Substanz auf dem Lymphweg zu dem Hauptentzündungsherd gelangt. Klee berichtet, daß er durch rechtzeitige Anwendung von Prontosil bei Anginen keine Jugularisunterbindung mehr durchzuführen brauchte. Nicht jede Angina soll chemotherapeutisch behandelt werden, die auch mit einem Prießnitzumschlag zu heilen ist, sondern nur die schweren Fälle oder solche, bei denen es auf eine besonders rasche Heilung ankommt.

Ueber gute Erfolge bei Streptokokken-Meningitis berichten Appelbaum, Neal u. a. Während Appelbaum 1936 von 20 Patienten noch 19 sterben sah, konnte er 1937 durch Prontosil 21 von 26 Patienten retten. Er kombinierte die Verabreichung von Prontosil solubile 2,5 Proz. 10 ccm alle 4 Std. intramuskulär mit oralen Gaben von Prontosil album 0,3—0,9 g alle 4—6 Std. Nach Neal betrug die Gesamtmortalität vor Anwendung der neuen Medikamente ca. 95 Proz. und jetzt ca. 20 Proz. Von französischen Forschern wie Caussé, Loiseau, Giesselbrecht, Rouget und Vaidie, Lallemant, Polet u. a. wurde das dem Prontosil rubrum sehr nahe verwandte Rubiazol mit Erfolg bei Streptokokken-Meningitiden angewendet. Vereinzelt wurde Prontosil solubile auch intralumbal verabreicht, diese Verabreichungsart sollte jedoch nur für ganz verzweifelte Fälle vorbehalten werden, bis mehr Erfahrungen über diese Anwendungsart in der Klinik vorliegen.

Auch bei chronischen Gelenkarthritiden und bei anderen durch Streptokokken bedingten Erkrankungen sind beachtliche Erfolge berichtet worden.

Außerdem erwies sich Prontosil bei den durch Colibazillen und andere Keime bedingten Infektionen des Nierenbeckens und der Harnblase als gut wirksam. Es ist dabei empfohlen worden, bei Säuglingen ½—3 Tabletten täglich zu geben, bei Schulkindern 4, bei Erwachsenen 6 Tabletten täglich.

Mehrfach hat sich die orale Anwendung von Prontosil rubrum auch bei Bang-Infektionen des Menschen gut bewährt, z. B. bei einer Dosierung von 3—6 Tabletten à 0,3 g täglich. Daß die Bang-Infektion des Menschen so gut und leicht beeinflußbar ist, liegt zum Teil wahrscheinlich darin begründet, daß die Bang-Infektion des Menschen überhaupt relativ leicht ist im Vergleich zum Verlauf der Krankheit bei Rindern, über deren Beeinflussung noch keine eindeutigen Ergebnisse vorliegen; wahrscheinlich hat man bisher auch noch nicht die vermutlich erforderlichen hohen Dosen in genügend kurzen Abständen verabreicht.

Gegenüber anderen Infektionen wurden später im Tierexperiment als besonders gut wirksam die folgenden Substanzen gefunden:

Uliron (Diseptal A) $H_2N-C_6H_4-SO_2NH-C_6H_4-SO_2N(CH_3)_2$

Diseptal B $H_2N-C_6H_4-SO_2NH-C_6H_4-SO_2NHCH_3$

Diseptal C $H_2N-C_6H_4-SO_2NH-C_6H_4-SO_2NH_2$

Diese Substanzen zeigten im Vergleich zu den Prontosilen eine gewisse verbesserte Wirkung gegenüber Staphylokokkeninfektionen, Pneumokokken und anaeroben Gasbranderregern. Die perorale Darreichung hat Anwendung gefunden bei Osteomyelitis, Karbunkeln usw. Zur lokalen Behandlung von Furunkeln und anderen Hautaffektionen kann man die Substanzen auch aufstreuen, oder man verwendet 1proz. Lösungen von Prontosil resp. den Diseptalen in Alkohol-Azeton zum Aufpinseln. Am erstaunlichsten ist die Wirkung gegenüber anaeroben Gasbranderregern, also Keimen, die selbst durch gute Desinfektionsmittel schon außerhalb des Körpers nur außerordentlich schwer beeinflußbar sind.

Auch gegenüber Gonokokken erwiesen sich diese Verbindungen als gut wirksam. Die ersten bei den experimentellen Gonokokkeninfektionen wirksamen Sulfonamidverbindungen hatten wir bereits im Jahre 1934 aufgefunden. Bei dieser Infektion erwies sich die Prüfung als besonders schwierig. Die Ueberlegenheit des Uliron und der Diseptale gegenüber Prontosil album zeigte sich in Versuchen, wie beispielsweise dem folgenden:

Von mit Gonokokken ip. infizierten, nichtbehandelten Mäusen überlebten 30 Proz.
Von mit Prontosil album behandelten Mausen uberlebten . . . . 60 „
Von mit Diseptal C behandelten Mäusen überlebten hingegen . . . . . 90 „

In einem Versuch, in dem von den nicht behandelten Kontrollen 35 Proz. die Infektion überlebten, überlebten von den mit Uliron 3mal per os behandelten Tieren je nach der Dosierung 80 Proz. resp. sogar 90 Proz. die Infektion. In Versuchen, in denen sämtliche Kontrollen der Infektion erlagen, überlebten bei nur einmaliger Behandlung mit Diseptal C bis zu 60 Proz. der Tiere.

Das Verdienst, die ersten Prüfungen dieser Substanzen bei den Gonokokkeninfektionen des Menschen durchgeführt zu haben, gebührt Grütz. Im allgemeinen behandelt man heute in Deutschland 4—6 Tage lang und verabreicht täglich 3—4 g Uliron. Ist eine Wiederholung dieses Stoßes notwendig, so erfolgt er nach 8—10tägiger Pause. Am besten scheint die Gonorrhöe der Frau anzusprechen, weniger die akute Gonorrhöe des Mannes. Viele Autoren warten daher bei der letzteren 8—10 Tage ab und führen in dieser Zeit höchstens Spülungen mit schwachen Kaliumpermanganatlösungen durch, ehe sie mit der Chemotherapie beginnen. Die besten Erfolge bei Männern

werden scheinbar erzielt durch Kombination mit schwachen Kaliumpermanganatspülungen auch während der Zeit der chemotherapeutischen Behandlung. Auch bei der sonst schwer zu beeinflussenden Vulvovaginitis der Kinder sind beachtliche Erfolge erzielt worden. Nach Felke dauert heute die Behandlung der Go-Arthritiden genau so viele Tage wie früher Wochen. Während man bei allen Infektionen am zweckmäßigsten so früh als möglich behandelt, scheint bei der Gonorrhöe eine Ausnahme zu bestehen, wenn auch einige Autoren bisweilen bei ganz frischen Fällen beachtliche Erfolge gesehen haben. Aber nach unseren Betrachtungen über den Wirkungsmechanismus dieser Substanzen scheint uns auch diese merkwürdige Erscheinung heute verständlicher; es muß bereits eine gewisse Abwehrbereitschaft bestehen, insbesondere müssen erst genügend Leukozyten und Histiozyten in der Schleimhaut vorhanden sein.

Experimentell ließen sich durch Uliron und die Diseptale ähnliche günstige Ergebnisse wie bei der Gonokokkeninfektion auch bei der Meningokokkeninfektion bei Mäusen erzielen. Auch aus der Klinik ist bereits von einigen Autoren über Erfahrungen mit der peroralen Darreichung von Uliron oder Diseptal C bei dieser Erkrankung berichtet worden, in einigen Fällen war schon 24 Std. nach Beginn der peroralen Ulirondarreichung eine deutliche Abnahme der Keime im Liquor nachweisbar.

Bei Pneumokokken ist nach unseren Erfahrungen die Wirkung der zuletzt genannten Verbindungen den Prontosilen ebenfalls überlegen. Besonders bemerkenswert ist, daß chemotherapeutische Wirkungen nicht gegenüber einem Pneumokokkentyp, sondern gegenüber allen Typen nachweisbar sind.

Ueber die Wirkung des Prontosil album wurde auch von amerikanischen Autoren, wie Gross und Cooper, Rosenthal, Bauer und Branham berichtet. Gross und Cooper kommen zu dem Ergebnis, daß die mit Prontosil album zu erzielenden Erfolge nicht schlechter wären als die mit spezifischen Seren erreichbaren.

Nach unseren eigenen Untersuchungen erscheint mir noch besonders bemerkenswert, daß bisweilen Pneumokokken von Typ III ein relativ gutes Ansprechen auf Prontosil zeigen, vielleicht weist das auf eine besonders nahe biologische Verwandtschaft des Typus III zu den Streptokokken hin. So wurden beispielsweise 10 mit Typ III durch Aspiration infizierte Mäuse einmal mit Prontosil solubile subkutan behandelt, je 2 Mäuse erhielten von der 4proz. Lösung pro 20 g Körpergewicht 2,0 ccm, je 2 weitere 1,0 ccm resp. 0,4 ccm, 0,2 ccm und 0,1 ccm. Von den 10 behandelten Tieren überlebten bereits 5 die Infektion, während von 20 unbehandelten Kontrollen nur ein einziges Tier überlebte.

In letzter Zeit hat Osterholz aus dem von Gundel geleiteten Institut über Untersuchungen zur Chemo- und Serotherapie der experimentellen Pneumokokkeninfektion berichtet. Danach gelang es nicht, mit Prontosil, Uliron oder Taurolin die Pneumokokkeninfektion der weißen Maus nach intraperitonealer Einverleibung der Keime günstig zu beeinflussen. Hingegen erzielte Osterholz bei nasaler Infektion, die bei den Kontrollen zu einer tödlich verlaufenden Pneumonie führte, teilweise überraschend günstige Ergebnisse mit Prontosil und Uliron; Taurolin war auch hierbei ohne Wirkung.

Fourneau und seine Mitarbeiter Tréfouel, Nitti und Bovet wiesen auf die gute Pneumokokkenwirkung einer den obigen Substanzen verwandten Sulfonverbindung hin, die 1908 von Fromm und Wittmann in Freiburg i. Br. hergestellt worden war. Nach unseren Untersuchungen wirkte diese Substanz,

$$CH_3CONH\langle\quad\rangle SO_2\langle\quad\rangle NHCOCH_3$$

obwohl sie in Wasser unlöslich ist, bei subkutaner Darreichung besser als bei peroraler; außerdem ist sie bei oraler Verabreichung schlecht verträglich und erzeugt Krämpfe bei Dosen, die subkutan vertragen werden.

Levaditi brachte durch seine experimentellen Arbeiten auf dem Gebiet der Chemotherapie der Pneumokokkeninfektionen interessante Beiträge zum Wirkungsmechanismus der genannten sowie verwandter Substanzen. Levaditi und seine Mitarbeiter stellten zunächst die Tatsache fest, daß virulente Pneumokokken mit gut ausgebildeter Kapsel, die in die Bauchhöhle von Mäusen eingebracht werden, trotz innigen Kontaktes mit den Leukozyten nicht phagozytiert wurden. Nicht virulente, nicht eingekapselte Pneumokokken wurden sowohl von den Leukozyten als auch von den Makrophagen rasch phagozytiert und vernichtet. Unter der Einwirkung chemotherapeutisch wirksamer Substanzen — Levaditi berichtet in seinen Versuchen über das 4-Nitro-4'acetylaminodiphenylsulfoxyd und das Goldpräparat Aurodetoxin — wurde jedoch auch bei virulenten Pneumokokken die Kapselbildung verhindert, so daß sie im lebenden Mäuseorganismus rasch eine Beute der Phagozyten wurden.

Witby berichtet über eine dem Prontosil album verwandte Substanz, die noch einen Pyridinring enthält und eine besonders gute Pneumokokkenwirkung zeigen soll

NH_2 ⟨⟩ SO_2NH ⟨N⟩

Die Pneumokokkenwirkung dieser Substanz ähnelt nach unseren Versuchen der der Diseptale. Wir sahen keine nennenswerte Ueberlegenheit gegenüber Uliron und den Diseptalen bei Berücksichtigung der Verträglichkeit.

Bevor man sich über die mögliche Wirkung der genannten Substanzen in der Praxis, namentlich bei der kruppösen Pneumonie, ein Bild machen kann, wird es nötig sein, sich darüber klar zu werden, welcher Wirkungsmechanismus diesen Substanzen zukommt und gegenüber welchen Typen von Pneumokokken sie eine Wirkung entfalten müssen. Denn bei der heute am stärksten verbreiteten Ansicht über die Ursache der kruppösen Pneumonie wird bestimmten Pneumokokkentypen eine ganz überragende Bedeutung eingeräumt. Als Erreger der kruppösen Pneumonie werden in erster Linie die am häufigsten vorkommenden Typen I und II angesprochen, als bösartigster gilt Typ III; als Typ III wird der Pneumococcus mucosus angesehen; er kommt hauptsächlich in Frage als Erreger von Mittelohrentzündungen. In der Gruppe X werden die Typen zusammengefaßt, denen hauptsächlich als Erreger der Bronchopneumonien eine Bedeutung zugeschrieben wird. In der Untergruppe X sind etwa 30 Arten zusammengefaßt. Die einzelnen Typen lassen sich serologisch durch Agglutinationen unterscheiden. Die Gruppenspezifität soll bedingt sein durch für den Typ charakteristische Kohlehydrat-Eiweißverbindungen. Die Typenbestimmung der Pneumokokken im Interesse einer therapeutischen Serumbehandlung geht aber längst nicht immer so rasch, wie es bisweilen geschildert wird und wie es im Interesse der Serumtherapie wünschenswert wäre.

Im allgemeinen wird heute angenommen, daß die Typen I und II in 70—80 Proz. als Erreger der kruppösen Pneumonien in Frage kommen. Nach den Untersuchungen von Gundel wurden bei 137 klinisch sicheren Fällen von kruppöser Pneumonie gefunden:

der Typus	I	in 97 Fällen	= 70,8	Proz.
	II	in 32 „	= 23,4	„
	III	in 8 „	= 5,8	„
	X	in 0 „		

Bei 102 Fällen kruppöser Pneumonie, die durch Empyem kompliziert waren, fand G. im Empyemeiter:

Typus			
I	77 Fälle	= 75,5	Proz.
II	20 „	= 19,6	„
III	5 „	= 4,9	„
X	0 „		

Gelegentlich können auch andere Pneumokokkentypen und sogar andere Bakterien als Erreger der kruppösen Pneumonie auftreten. Es kommt also nicht allein den Erregern für das Zustandekommen des typischen Krankheitsbildes eine Rolle zu. Schon seit längerer Zeit vermutet man, daß die kruppöse Pneumonie den allergischen Erkrankungen zuzurechnen ist (Rößle, Lauche, Loeschke u. a.). Demnach würde noch mehr als bei anderen Infektionskrankheiten dem jeweiligen Reaktionszustand des befallenen Organismus eine Rolle beim Zustandekommen des typischen Krankheitsbildes der kruppösen Pneumonie zufallen, und es taucht die Frage auf, ob in diesem Fall die spezifischen Seren und Substanzen, die chemotherapeutisch bei Pneumokokkeninfektionen der Tiere wirksam sind, für die Behandlung der kruppösen Pneumonien überhaupt noch entscheidend mitwirken können.

Lauche nimmt an, daß in einem durch eine Pneumokokkeninfektion sensibilisierten Organismus es dann zur Entwicklung einer kruppösen Pneumonie kommt, wenn bei der Reinfektion die Pneumokokken von der Bronchialschleimhaut aus auf dem Lymphweg in die Hilusdrüsen gelangen, sich hier vermehren und nun rückläufig den Lungenlappen infizieren. Loeschke ist anderer Ansicht; nach den Untersuchungen dieses Forschers beginnt die kruppöse Pneumonie in einem durch eine vorhergehende Pneumokokkeninfektion sensibilisierten Organismus in der Peripherie des Azinus, und zwar mit einer primären Exsudation in die Alveolen. Die Exsudation findet statt als hyperergische Reaktion im sensibilisierten Organismus. Deshalb ist auch das Exsudat im Beginn der kruppösen Pneumonie reich an Pneumokokken. Erst bei fortschreitender Entzündung kommt es dann zu Fibrinausscheidung in die Alveolen. In diesem bei der hyperergischen Reaktion entstehenden reichlichen Exsudat finden die Pneumokokken einen idealen Nährboden, und solange die humoralen Abwehrstoffe fehlen, breitet sich die Pneumonie durch Aspiration dieses Pneumokokken-haltigen Exsudats vom Primärherd ringförmig aus infolge Vordringens des Pneumokokken-haltigen Exsudats in die Nachbaracini und Lobuli bis schließlich über den ganzen Lappen. Durch Aspiration dieses Pneumokokken-haltigen Exsudats kann sich bisweilen — oft mechanisch durch Tieflagerung usw. begünstigt — die Infektion explosionsartig auf einen anderen Lappen ausbreiten oder auf die andere Lunge ausdehnen. Diese Vorstellung Loeschkes erklärt am einfachsten die Ausbreitungsvorgänge der Entzündung bis zu den Lappengrenzen, an denen mechanisch der Uebertritt des Pneumokokken-haltigen Exsudats dann größeren Widerstand findet. Erst wenn es dem Körper gelingt, genügend Mengen humoraler Abwehrstoffe zu mobilisieren, können die in genügender Anzahl vorhandenen Leukozyten die Bakterien phagozytieren und restlos verdauen. Die Resorption des Fibrins erfolgt nach Loeschke nicht durch Fermente der Leukozyten, wie vielfach angenommen, sondern durch Alveolarepithelien der Lunge.

Experimentelle Stützen für die Annahme, daß die kruppöse Pneumonie eine allergische Erkrankung ist, ergaben sich aus den Versuchen von Neufeld und Kuhn sowie den Untersuchungen von Wadsworth, der bei partiell immunisierten Kaninchen Pneumonie erzeugen konnte. Blake und Cecil gelang es, bei Affen künstlich Pneumonie hervorzurufen; Stillmann und

Brauch, sowie Erös, Gyüre und Kramar erzielten durch mehrfache Inhalation von Pneumokokken bei Mäusen und Ratten der kruppösen Pneumonie des Menschen ähnelnde Veränderungen. Auch bei Meerschweinchen soll es gelungen sein, der kruppösen Pneumonie ähnliche Bilder zu erzeugen. Sensibilisiert man Meerschweinchen mit Extrakten aus toten Pneumokokken, so daß die Haut dieser Tiere allergische Reaktion aufweist, und läßt in diesem Stadium von den so sensibilisierten Meerschweinchen in Narkose Pneumokokken-haltige Flüssigkeit aspirieren, so kommt es nach Untersuchungen von Kline bei einem Teil der Fälle zu Bildern einer lobären Lungenentzündung, und zwar dort, wo die meisten Pneumokokken aspiriert wurden. Entsprechend können bisweilen aber auch andere Bakterien, beispielsweise Influenzabazillen ähnliche pneumonische Bilder hervorrufen. Großmann, einem Schüler von Loeschke, gelang es, bei sensibilisierten Kaninchen das Bild der lobären Pneumonie zu erzeugen. Durch intrakutane Vorbehandlung mit lebenden Pneumokokken konnte im Gegensatz zu den normalen Kontrolltieren eine hyperergische Reaktionsbereitschaft in der Lunge im Sinne von Rößle erzielt werden. Bei den vorbehandelten Tieren führte die intranasale Reinfektion zu einer verstärkten Lokalisation in der Lunge, während bei nicht vorbehandelten Tieren mehr die Neigung zu septischen Prozessen bestand; die bei sensibilisierten Tieren auftretenden Lungenveränderungen ähnelten in ihrem histologischen Charakter dem Anfangsstadium der kruppösen Pneumonien, vorherrschend war eine serös-leukozytäre Exsudation in die Alveolen. In zwei Fällen wurde auch nach unspezifischer Vorbehandlung eine ähnliche hyperergische Reaktion des Lungengewebes beobachtet.

In eigenen Versuchen machten wir folgende Beobachtung: 80 Mäuse wurden durch Aspiration mit einer abgetoteten 1:1000 verdünnten Pneumokokkenkultur vom Typ I vorbehandelt. 8 Tage nach dieser Vorbehandlung wurden 10 Tiere mit virulenten Pneumokokken durch Aspiration infiziert. Von diesen Tieren zeigten 3 von 5, die 24 Std. nach der Infektion untersucht wurden, keine Veränderungen an den Lungen, bei einem Tier waren verdickte Septen vorhanden, bei dem 5. fanden sich stellenweise peribronchial einige mit Leukozyten gefüllte Alveolen. Von den übrigen 5 Tieren, die 48 Std. nach der Infektion untersucht wurden, zeigte nur ein Tier kleine bronchopneumonische Herde und eitrige Bronchitis. Von 5 entsprechend infizierten, aber nicht vorbehandelten Tieren zeigten 24 Std. nach der Infektion 4 ebenfalls keine Lungenveränderungen; nur bei einem Tier fand man peribronchial und subpleural in kleinen herdförmigen Bezirken einige Alveolen mit Leukozyten gefüllt; von 5 Kontrolltieren, die nicht vorbehandelt waren und 48 Std. nach der Infektion untersucht wurden, zeigte ebenfalls nur ein Tier kleine bronchopneumonische Herde. Die restlichen 70 Tiere des Versuchs, die einmal mit abgetöteten Pneumokokken vorbehandelt worden waren, wurden eine Woche nach der ersten Vorbehandlung erneut durch Aspiration mit einer abgetöteten Pneumokultur vorbehandelt. 8 Tage nach dieser 2. Vorbehandlung wurden wiederum 10 Tiere durch Aspiration mit einer virulenten Kultur von Pneumokokken Typ I infiziert. Diesmal zeigten von den 5 24 Std. nach der Infektion untersuchten Tieren alle 5 herdförmige Pneumonien. Von den 5 nicht vorbehandelten Tieren nur 2, von den 4 48 Std. nach der Infektion untersuchten und 2mal vorbehandelten Tieren zeigten 3 Bronchitis und Bronchopneumonie; von den 5 nicht vorbehandelten Tieren zeigte 48 Std. nach der Infektion kein Tier Lungenveränderungen. Man sieht also, daß bereits nach 2maliger Vorbehandlung mit abgetöteten Kokken die Entzündungsbereitschaft in der Lunge eine größere ist als bei den nicht sensibilisierten Kontrollen. Die restlichen 60 2mal mit abgetöteten Kokken sensibilisierten Tiere wurden 8 Tage nach der 2. Vorbehandlung durch Aspiration mit einer 1:100000 verdünnten lebenden Pneumokokkenkultur vorbehandelt. 10 Tage nach dieser Vorbehandlung mit einer stark verdünnten lebenden Kultur wurden 10 Tiere wiederum mit einer konzentrierten virulenten Kultur von Pneumokokken von Typ I infiziert.

Auch bei einem Teil dieser Tiere traten wiederum bronchopneumonische Herde auf, nur bei 1 Tier wurde ein ausgedehnter pneumonischer Herd beobachtet, in dem die Alveolen mit Leukozyten und Histiozyten ausgefüllt waren. Bei den entsprechend nicht vorbehandelten Kontrollen war die Neigung zur Bildung bronchopneumonischer Herde wiederum geringer als bei den vorbehandelten Tieren. Auch durch weitere Vorbehandlungen mit verdünnten Pneumokokkenkulturen und nachfolgender Infektion durch Aspiration konzentrierter Kulturen konnten ausgedehntere Pneumonien nicht zahlreicher beobachtet werden, im Gegenteil

waren nach 5- und 6maliger Vorbehandlung die Pneumonien bei den vorbehandelten Tieren nicht häufiger als bei den Kontrollen. Ausgedehnte, fast einen ganzen Lappen einnehmende pneumonische Herde wurden in dem ganzen Versuch nur vereinzelt beobachtet. Meist entwickelten sich in dieser Versuchsreihe bei den mit einer stark verdünnten Kokkenkultur sensibilisierten Tieren nur herdförmige Pneumonien.

Aehnlich verlief ein entsprechend angelegter Versuch, in dem die Tiere zunächst mit abgetöteten und dann mit stark verdünnten Kulturen von Typ II vorbehandelt und dann mit konzentrierten Kulturen desselben Typs durch Aspiration infiziert wurden. Nur bei einem Teil der sensibilisierten Tiere traten bronchopneumonische Herde auf, bei 1- und 2mal vorbehandelten Tieren häufiger und ausgedehnter als bei den zur Kontrolle stets mitinfizierten, aber nicht vorbehandelten Tieren. Merkwürdigerweise waren bei den mehrfach vorbehandelten Tieren die Pneumonien nicht häufiger zu beobachten als bei den 1- oder 2mal vorbehandelten. Man hätte doch annehmen können, daß bei mehrfach vorbehandelten Tieren die Reaktion immer stärker im Sinne einer Pneumonie abgelaufen wäre. Aber eher schien das Gegenteil der Fall zu sein. Das konnte unter Umständen darauf beruhen, daß inzwischen einige der vorbehandelten Tiere eine völlige Immunität erworben hatten. Um die Beobachtung übersichtlicher zu gestalten, wurden deshalb in einem folgenden Versuch jeweils 20 Tiere nur ein einziges Mal mit abgetöteter Pneumokokkenkultur von Typ I durch Aspiration vorbehandelt. In diesem Versuch wurde jedoch nicht wie im vorher beschriebenen eine stark verdünnte abgetötete, sondern eine konzentrierte 24stündige abgetötete Kultur benützt, um einen stärkeren einmaligen Sensibilisierungseffekt zu erzielen. Je 5 Mäuse wurden durch Aspiration von konzentrierter Kultur (Pneumokokken Typ I) nach 8 Tagen, 14 Tagen, 4 Wochen und 8 Wochen erneut infiziert. Von den 5 8 Tage nach der Vorbehandlung infizierten Tieren entwickelten sich bei dreien innerhalb von 24—48 Std. nach der Infektion ausgedehnte pneumonische Herde bis zur Ausdehnung über einen ganzen Lappen; 2 zeigten keinen Befund; von den unbehandelten Kontrollen zeigte sich hingegen nur bei einem Tier eine herdförmige Pneumonie, 4 wiesen außer geringen Septenverdickungen in der Lunge keinen Befund auf. Die durch Vorbehandlung mit abgetöteten Kokken sensibilisierten Tiere weisen also eine stärkere Neigung zur Ausbildung einer Pneumonie auf. Bei den Tieren, die 14 Tage, 4 Wochen und 8 Wochen nach der Vorbehandlung die Hauptinfektion erhielten, war der Unterschied zwischen Kontrollen und vorbehandelten Tieren nicht mehr so groß.

Es zeigte sich also wiederum ebenso wie in weiteren Versuchen, daß mit zunehmendem Abstand von der Vorbehandlung die vorbehandelten Tiere sich allmählich wieder wie die Kontrollen verhalten und keine stärkere Neigung als diese zur Ausbildung einer Pneumonie zeigen. Ob dies auf einer inzwischen eingetretenen Immunität beruht oder auf einer geringen Reaktionsbereitschaft des Gewebes, läßt sich nach diesen Versuchen noch nicht sicher sagen, da die infizierten Tiere vor dem natürlichen Ablauf der Infektion zum Zweck der histologischen Untersuchung getötet wurden. Auch bei weiteren Versuchen mit den Pneumokokken Typ II zeigte sich, daß kurze Zeit nach der Vorbehandlung mit abgetöteten Kokken und sehr stark verdünnten lebenden Kulturen die Reaktionsbereitschaft der Lunge zur Ausbildung von Pneumonien viel stärker ist als bei nicht sensibilisierten Kontrollen. Nach Vorbehandlung mit abgetöteten Pneumokokken (Typ II, Aspiration) entwickelten sich bei der Hauptinfektion eine Woche nach der Vorbehandlung bei 5 Tieren:

Herdförmige Bronchopneumonien . .	1
Ausgedehnte Pneumonien	4

Von 5 Kontrollen zeigten hingegen 4 Tiere keinen pathologischen Lungenbefund, sondern nur ein einziges Tier; die lokale Abwehr der Lunge als dem Ort der Infektion war bei den vorbehandelten Tieren also deutlich stärker als bei den nicht sensibilisierten Kontrollen, was auch dadurch deutlich zum Ausdruck kommt, daß alle 24 Std. nach der Infektion noch nicht getöteten Tiere, die nicht vorbehandelt waren, vorzeitig spontan starben, während von den vorbehandelten Tieren nur ein einziges Tier erlag.

Bronchopneumonien und auch Lappenpneumonien traten bei den mit Pneumokokken Typ II durch Aspiration infizierten Mäusen sowohl bei den vorbehandelten als auch bei den nicht vorbehandelten Tieren auf; am stärksten schien auch in diesem Versuch die Neigung zur Pneumonie ca. 8 Tage nach der

Sensibilisierung zu sein. Im allgemeinen ergab sich, daß von den nicht vorbehandelten schon vor dem 3. Tag nach der Infektion mehr Tiere eingingen als von den vorbehandelten.

Bei Versuchen mit Pneumokokken Typ III war ganz besonders auffallend das vollkommen andere histologische Bild der Pneumonie, vor allem der Reichtum des Exsudats an ganz eigenartig großen, histiozytären Zellen. Um die Herde, in denen Histiozyten und Leukozyten in den Alveolen sind, findet sich gewöhnlich ein ausgedehntes Gebiet, in dem die Alveolen von einem zellfreien Exsudat ausgefüllt sind, das sich bei Kresylviolettfärbung metachromatisch rot färbt. Oft ist dieses Exsudat sehr reich an Kokken, die infolge ihrer Schleimhülle sich mit Kresylviolett stark metachromatisch rot färben. Schon beim Schneiden auf dem Gefriermikrotom fällt die ganz andere Beschaffenheit des Exsudats in den Lungen auf, da die Schnitte stark am Messer kleben. Bei den Versuchen mit Typ III war der Unterschied zwischen Kontrollen und sensibilisiertem Tier nicht so deutlich wie bei Typ I und II.

Aus den Versuchen ergibt sich, daß die Typen I und II besonders gut zu einer Sensibilisierung geeignet sind und daher bei den spezifisch sensibilisierten Tieren die Infektion zur geeigneten Zeit auch am häufigsten zur Ausbildung einer Pneumonie führt. Jedoch dürfen auch unspezifische Sensibilisierungen in ihrer Bedeutung nicht unterschätzt werden. So ließ sich z. B. in einem unserer Versuche beobachten, daß die intranasale Infektion mit Typ I bei einer bestimmten Kulturverdünnung bei nicht sensibilisierten Kontrollen 24 Std. nach der Infektion nur zur Ansammlung von Leukozyten um die Bronchialäste herum geführt hatte, hingegen dieselbe Kulturverdünnung bei Tieren, die 24 Std. vorher durch eine intramuskuläre Terpentininjektion sensibilisiert worden waren, ausgedehnte pneumonische Herde erzeugte. Noch ausgesprochener war die stärkere Reaktion der Lunge bei den Tieren, die nach der i.m. Sensibilisierung durch Terpentin mit Typ II infiziert worden waren. Hier fanden sich zwar auch bei den nicht vorbehandelten Tieren bronchopneumonische Herde, doch war bei den sensibilisierten die entzündliche Reaktion ausgesprochener, namentlich die exsudativen Prozesse.

Daß man bei Mäusen durch Vorbehandlung mit Extrakten aus Pneumokokken nicht nur eine Sensibilisierung, sondern auch einen hochgradigen Schutz gegen Pneumokokkeninfektion erzielen kann, ergibt sich aus zahlreichen Beobachtungen. Durch mehrmalige Vorbehandlung mit wässerigen Extrakten aus Pneumokokken, die mit Kohlensäureschnee zerrieben und dann steril filtriert worden waren, gelang es uns, Mäuse vor einer Infektion mit vielfach tödlichen Dosen zu schützen. Während z. B. in einem unserer Versuche sämtliche 10 nicht vorbehandelte Kontrollen der intraperitonealen Infektion erlagen, blieben von 16 Tieren, die mit Dosen von 0,1—1,0 ccm des Pneumokokkenextraktes vorbehandelt waren, 14 Tiere am Leben.

Die Wirkungsweise der spezifischen Seren läßt sich dadurch nachweisen, daß man Mäusen vor der Infektion mit tödlichen Dosen von Pneumokokken das entsprechende typenspezifische Serum injiziert. Die so vorbehandelten Tiere überstehen die schwere Infektion, während die unbehandelten Kontrollen nicht überleben. Auch bei Pneumokokken-infizierten Kaninchen läßt sich der Heilwert guter Seren nachweisen. Die Wirkung des Serums ist nach den Untersuchungen von Bieling und Oelrichs um so besser, je früher nach der Infektion es zur Anwendung kommt. Wirksame Immunseren lassen sich beim Kaninchen und besonders auch beim Pferd gewinnen. Die Wirkung der Seren ist zu sehen in einer direkten Einwirkung auf die Pneumokokken, deren

Kapsel unter der Einwirkung der Immunseren aufquillt, zum Teil auch in einer Lyse der Pneumokokken. Diese letztere Wirkung des Serums kommt offenbar nur im Zusammenhang mit dem lebenden Organismus zustande, z. B. in der Bauchhöhle von Meerschweinchen, denen man gleichzeitig Pneumokokken und das entsprechende Immunserum injiziert; im Reagenzglas führte der Zusatz von Serum zu den entsprechenden Pneumokokken nicht zu völliger Abtötung, jedoch verlieren die Pneumokokken, auf die man im Reagenzglas Immunserum einwirken läßt, zum Teil die Fähigkeit, bestimmte Kohlehydrate zu vergären. Gleichzeitig erfährt die Virulenz der mit Immunserum behandelten Pneumokokken eine Abnahme. Während die im Blut der infizierten Tiere kreisenden Pneumokokken relativ gut erfaßt werden können. ist die Beeinflussung der in der Lymphe und in den Geweben befindlichen Erreger nach den Untersuchungen von Bieling sehr viel schwieriger (Bieling, Entstehung und biologische Bekämpfung typischer Infektionskrankheiten. Verlag Ambrosius Barth, Leipzig, 1937). Die chemotherapeutisch wirksamen Substanzen wirken aber in anderer Richtung als die Seren. Neben der von Levaditi beschriebenen Verhinderung der Kapselbildung läßt sich nach unseren Versuchen bei den wirksamen chemotherapeutischen Substanzen aus der Sulfonamid- und Sulfon-Reihe teilweise auch eine in-vitro-Wirkung nachweisen, indem der Zusatz dieser Substanzen zu den Nährböden, auf die man Pneumokokken aufimpft, das Wachstum der Pneumokokken verhindert oder wenigstens hemmt. Die Sulfonverbindung

$$CH_3CONH\text{-}C_6H_4\text{-}SO_2\text{-}C_6H_4\text{-}NHCOCH_3$$

zeigt aber selbst bei hohen Konzentrationen keinen Hemmungseffekt, obwohl sie im infizierten Tier deutlich wirkt. Aehnlich wie bei analogen Versuchen mit Streptokokken ergibt sich also auch hier keine vollkommene Parallelität zu den Tierversuchen. Immerhin können uns diese in-vitro-Versuche eine gewisse Vorstellung von dem Wirkungsmechanismus dieser Substanzen vermitteln. Die Substanzen, die in vitro auf diese Weise keine Wirkung erkennen lassen, aber trotzdem im lebenden Makroorganismus eine deutliche Einwirkung auf die Pneumokokkeninfektion zeigen, wie z. B. die genannte Sulfonverbindung, werden im Organismus wahrscheinlich erst eine Umwandlung in die wirksame Komponente erfahren. Daß damit aber die Wirkungsweise der Substanzen noch nicht restlos erklärt ist, ergibt sich in ähnlicher Weise wie bei den Streptokokkeninfektionen auch hier.

Ist die vorher dargelegte Ansicht über die Entstehung der kruppösen Pneumonien richtig, so kommt dem jeweiligen Reaktionszustand des Organismus beim Eintritt der Infektion eine große Bedeutung zu. Als Erreger kommen dann also nicht nur die Pneumokokkentypen I und II in Frage, sondern, wenn auch seltener, auch andere Pneumokokkentypen. Durch Beobachtungen von Aschoff und Goeters sowie Loeschke, Großmann u. a. ist sichergestellt, daß Typen aus der Pneumokokkengruppe X auch bei echten kruppösen Pneumonien gar nicht so selten sind. Sogar Streptokokken sind als Ursache echter kruppöser Pneumonien beobachtet worden. Daß den Typen I und II eine überragende Bedeutung zukommt, mag zu erklären sein durch ihre höhere Virulenz und ferner m. E. dadurch, daß diese Keime eine sehr viel ausgesprochenere Sensibilisierung erzeugen, die anscheinend eine wesentliche Vorbedingung für das Zustandekommen der echten kruppösen Pneumonien ist. Haben wir Anhaltspunkte, daß den kruppösen Pneumonien beim Menschen solche sensibilisierenden Erkrankungen vorausgehen? In der Tat weisen immer mehr Kliniker darauf hin, daß kruppösen Pneumonien unscheinbare Erkältungskrankheiten wie Schnupfen, Bronchitis usw. voraus-

gehen, die zur Sensibilisierung führen. In einem Fall konnte ich die sensibilisierende Infektion mit Schnupfen und leichter Bronchitis bei einem 10jährigen Kind beobachten, bei dem Pneumokokken vom Typ X in der Sensibilisierungsperiode nachweisbar waren. Die Sensibilisierungsperiode verlief ohne wesentliche Symptome mit 1—2 Tagen erhöhter Temperatur Ende Mai. Am 10. Juni erkrankte das Kind nach einer Abkühlung ganz plötzlich mit 40° Fieber. Sehr bald stellte sich Husten und Nasenflügelatmen ein. Nach 2 Tagen etwas Reibung und Dämpfung über dem linken UL. Da kein Sputum auftrat, ließ sich der Typ der Pneumokokken der lobären Lungenentzündung nicht ermitteln. Nach einer Kontinua von 40° C und darüber schon nach wenigen Tagen kritische Entfieberung nach täglich 3mal 0,5 g Uliron. Die Dämpfung über dem linken UL. blieb zwar noch etwa 8 Tage nachweisbar. Prontosil album in den ersten Tagen hatte scheinbar keinerlei Wirkung, außerdem hatte das Kind Vitamin C und ein Schlafmittel mit Adalin erhalten.

Wie sind nun die Aussichten bei der Chemotherapie der kruppösen Pneumonie? Wie wir gesehen haben, gibt es eine Reihe von Substanzen, die, den Nährböden zugesetzt, das Wachstum der Pneumokokken hemmen oder die Erreger sogar ganz abtöten, und zwar zeigen die angeführten Substanzen den Vorteil, diese Wirkung gleichzeitig gegenüber allen Pneumokokkentypen zu entfalten, zumindest gegenüber den am häufigsten vorkommenden Typen I, II und III, außerdem aber auch noch gegenüber Streptokokken. Die besten Aussichten für das Einsetzen einer Chemotherapie sind natürlich auch die Frühstadien; zu dieser Zeit dürften dem Eindringen des Mittels in das Exsudat keine Schwierigkeiten entgegenstehen, die Kapillaren sind dann noch gut durchblutet. In späteren Stadien, wo die Alveolen prall mit Fibrin gefüllt sind und dadurch eine Komprimierung der Gefäße erfolgt und eine Blutleere in den hepatisierten Bezirken zustande kommt, dürfte das Eindringen der Mittel in den Alveoleninhalt nur noch schwer vorstellbar sein.

In der Klinik sind von Severin u. a. schon mit Prontosil sehr beachtliche Erfolge in der Behandlung von Pneumonien erzielt worden. Severin beobachtete, daß bei 85 Proz. der mit Prontosil behandelten Patienten eine Entfieberung in auffallend kurzer Zeit, oft innerhalb 3—4 Tagen, eintrat. Parallel mit einem lytischen Temperaturabfall gingen die klinischen Symptome zurück: der Perkussions- und Auskultationsbefund änderte sich im Sinne einer beschleunigten Lyse, eine Krise war nur in 2 Fällen zu beobachten. Auch die Rekonvaleszentenzeit war deutlich abgekürzt, obwohl die Patienten in schlechtem Allgemeinzustand eingeliefert wurden. Ueberhaupt zeigten die mit Prontosil behandelten Pneumonien einen weitaus leichteren und komplikationslosen Verlauf; besonders bei frischen Infiltraten hatte man den Eindruck einer Kupierung. Vielleicht dürfte es für den Kliniker noch erfolgversprechender sein, Uliron oder die Diseptale bei der kruppösen Pneumonie im Frühstadium anzuwenden, und zwar in Dosen von 3—4mal täglich 0,5 g per os. Diese Dosierung sollte ebenso wie bei der Gonorrhöe nur für die Dauer von 3—4 Tagen durchgeführt werden, um mit Sicherheit jede Nebenwirkung zu vermeiden. Der Erfolg müßte sich dann darin äußern, daß die kritische Entfieberung nicht erst wie üblich am 7. oder 9. Tag einsetzt, sondern je nach dem Zeitpunkt des Beginnes der chemotherapeutischen Behandlung wesentlich früher. Auch dürfte, wenn die Behandlung rechtzeitig genug einsetzt, damit überhaupt die Ausbreitung auf einen ganzen Lungenlappen oder sogar mehrere Lungenlappen verhindert werden und damit wohl auch das gefürchtete Versagen des Herzens bei kruppösen Pneumonien, sowie das Auftreten von Empyemen und anderen Komplikationen. Ich zweifle nicht daran, daß es der bewährten Gemeinschaftsarbeit zwischen dem for-

schenden Arzt und Chemiker gelingen wird, auch noch gegen Pneumokokken wirksamere Substanzen zu finden als die genannten. Dafür sprechen eine ganze Reihe inzwischen von uns durchgeführter Versuche.

Bei den Betrachtungen über das Wesen der kruppösen Pneumonie kann man sich am einfachsten und eindringlichsten klar machen, wo die natürlichen Grenzen der Chemotherapie liegen.

Auch bei den experimentellen Streptokokkeninfektionen der Kaninchen ließen sich die anatomisch bedingten Grenzen der Chemotherapie sehr deutlich verfolgen. Bisweilen traten im Gefolge schwerer Muskelphlegmonen schon 48 Std. nach der Infektion sehr hochgradige Gefäßveränderungen an Venen und Arterien auf, die unmöglich noch ohne einen bleibenden Schaden ausheilen können. Ganz besonders auffallend war bei diesen schweren Streptokokkenerkrankungen die Beteiligung des ganzen Gefäßsystems, seien es die Kapillaren der Leber, in denen die Endothelien durch die Giftwirkung der Streptokokken zu ausgedehntem und raschem Zerfall kommen oder seien es die schweren Veränderungen an größeren Gefäßen oder die Veränderungen am Endokard, das ja ebenfalls dem Gefäßendothel zugerechnet werden könnte. Trotz dieser foudroyant fortschreitenden Infektion war es uns aber auch in diesem Stadium oft noch möglich, Kaninchen durch die intensive Behandlung mit Prontosil vor dem Tode zu retten.

Die an den nicht behandelten Kaninchen mit Streptokokkenphlegmonen beobachteten anatomischen Veränderungen zeigen uns also gleichfalls die Grenzen der Chemotherapie auf, die naturgemäß auch bei den menschlichen durch Streptokokken bedingten Erkrankungen für die Chemotherapie vorhanden sind. Die bei nicht behandelten Kontrollkaninchen beobachteten schweren Endokard- und Gefäßveränderungen müssen bei längerem Bestehen zu irreparablen Schäden führen. Auch die Streptokokkeninfektionen des Menschen zeigen ganz ähnliche charakteristische Verlaufsformen, wie wir sie bei den Muskelphlegmonen der Kaninchen sehen, nur daß bei Menschen so akut und foudroyant verlaufende Streptokokkeninfektionen seltener sind und wir mehr subakute und chronische Infektionen haben. Es ist sehr schwer vorstellbar, daß bei ausgedehnten Nekrosen und Thrombosen das chemotherapeutische Mittel immer noch in genügender Konzentration an den Herd herankommen kann. Stellt man sich einmal die anatomischen Verhältnisse bei der Glomerulonephritis vor, die in den meisten Fällen auch als typische Streptokokkeninfektion anzusprechen ist — nach Volhard sind die meisten Fälle von Glomerulonephritis durch Streptokokken bedingt — so erfolgt das bevorzugte Angreifen der Kokken oder ihrer Toxine, wie vorher an anderen Organen geschildert, auch an den Gefäßen, und zwar hauptsächlich an den Kapillaren des Glomerulus. Daß die Glomerulonephritis so besonders häufig bei einer bereits bestehenden Endokarditis auftritt, beruht m. E. darauf, daß nun von diesem Sekundärherd aus immer wieder eine Einschwemmung in den großen Kreislauf erfolgt und davon auch die Nieren betroffen werden, während bei allen Entzündungsherden in der Peripherie zunächst die Lunge als Filter dient. Bei dem Zustandekommen der Glomerulonephritis spielen außerdem in vielen Fällen noch allergische Reaktionen eine Rolle, indem das Kapillarendothel der Glomeruli durch immer wiederkehrende Reizungen sensibilisiert und besonders reaktionsbereit geworden ist. Ist man sich aber erst einmal über die anatomischen Verhältnisse bei der Glomerulonephritis klar geworden, so wird man auch hier nur in den ersten Stadien eine Heilung erwarten können; denn sind erst einmal Verwachsungen der Kapillarschlingen untereinander oder mit der Glomeruluskapsel aufgetreten, muß der Prozeß zu einem irreparablen Schaden führen, ganz gleich, ob es gelingt, die Erreger

noch abzutöten oder nicht. Werden wir uns so einerseits über die Grenzen dessen, was wir von einer erfolgreichen Chemotherapie erwarten können, klar, werden wir anderseits auch veralteten, unfruchtbaren Definitionen über die Sepsis entgegentreten müssen. Manche Autoren erkennen die primäre Eintrittspforte der Bakterien überhaupt nicht als Sepsisherde an, sie verlangen einen Gefäßherd, von dem aus dauernd oder in Schüben eine Einschwemmung der Bakterien erfolgt. Bevor ein solcher Herd nicht gefunden wird, soll keine Sepsis und auch nicht die Gefahr einer Sepsis vorliegen. Bei den Streptokokkeninfektionen wird es aber, wie ich an experimentellen Befunden gezeigt habe, oft schwer sein, makroskopisch einen solchen Gefäßherd aufzufinden, da der Einbruch der Streptokokken in das Gefäßsystem auch ohne eine Thrombophlebitis, ja sogar durch die Kapillarwände hindurch in erheblichem Umfange möglich ist. Es kommt m. E. aber gar nicht darauf an, nur Menschen zu retten, die nach der alten strengen Definition eine Sepsis haben, sondern unsere Aufgabe muß doch in erster Linie sein, möglichst viele Kranke durch rechtzeitige Behandlung von dem schwersten Zustand dieser Erkrankung und von dem Tode zu erretten. Und dies wird um so leichter sein, je weniger ausgedehnt und schwer die anatomischen Veränderungen sind. Man soll also, wenn irgendmöglich, nicht erst auf die Ausbildung eines klinisch feststellbaren Gefäßherdes oder eine typische Thrombophlebitis warten, denn in diesem Zustand wird auch die chemotherapeutische Beeinflussung des Krankheitsprozesses naturgemäß viel schwieriger werden. Treten erst einmal von der Blutbahn kaum noch erreichbare Nekrosen auf, so wird die Aussicht auf den zu erreichenden Erfolg schlecht. Das macht m. E. auch die Behandlung der chronischen Endokarditis so schwierig, denn die Herzklappen sind praktisch gefäßlose Häute; sind hier in nekrotischen Bezirken erst einmal Bakterienansammlungen entstanden, so dürften sie dem chemotherapeutischen Zugriff nur noch schwer zugänglich sein. Aus den soeben dargelegten anatomischen Gründen aber dürften sich als allgemeine Richtlinien für die chemotherapeutische Behandlung schwerer Kokkeninfektionen mit Prontosil und seinen Derivaten folgende ergeben:

1. Möglichst rasch einsetzende intensive Behandlung. Keine verzettelten kleinen Dosen!
2. Genügend große Dosen in kurzer Zeit 3—4 Tage lang. Wenn gar kein Erfolg, weitere Behandlung aussichtslos. Wahrscheinlich handelt es sich dann um Keime, die für Prontosil oder seine Derivate nicht angreifbar sind.
3. Wiederholung der Gaben alle 6—8 Stunden, damit der einmal erzielte Erfolg nicht verpufft. In schweren Fällen neben peroralen Dosen von Prontosil resp. Prontosil solubile 2,5 Proz. oder 5 Proz., alle 8 Std. 10—20 ccm intramuskulär.

In der Hand des kritischen Arztes werden bei guter Beobachtung des Patienten ernstliche Nebenerscheinungen stets zu vermeiden sein. Die bisweilen beobachteten Magenbeschwerden lassen sich schon meist dadurch verhindern, daß man die Tabletten mit etwas Brei verabreicht oder sie zerkauen und dann etwas nachtrinken läßt. Schockartige Erscheinungen sind nur vereinzelt nach intravenösen Gaben gesehen worden, wahrscheinlich bedingt durch einen zu raschen Kokkenzerfall. Seit Durchführung der intramuskulären Injektion sind sie nicht mehr beobachtet worden. Zur Vermeidung von Sulfhämoglobinämie und Zyanosen ist es zweckmäßig, die gleichzeitige Verabreichung von sulfatischen Abführmitteln oder einer sehr eiweißreichen Kost zu vermeiden; die Therapie besteht allein im Aussetzen weiterer

Gaben. Die häufigsten Nebenwirkungen wurden nach Darreichung von Prontosil album (dem p-Aminophenylsulfonamid) beobachtet. Die schlechtere Verträglichkeit des p-Aminophenylsulfonamid gegenüber den gefärbten Prontosilen, besonders dem am besten verträglichen Prontosil solubile, aber auch gegenüber dem Uliron und den Diseptalen zeigt sich im Experiment dann, wenn man 2,5proz. Lösungen resp. Suspensionen dieser Substanzen in Wasser oder Oel Mäusen von 20 g Körpergewicht in Dosen von 1 ccm intraperitoneal injiziert. Dann bekommen die mit p-Aminophenylsulfonamid behandelten Tiere Krämpfe, während die mit den übrigen genannten Substanzen behandelten vollkommen munter bleiben. In einigen Fällen hat man den Verdacht gehabt, daß das Auftreten einer Agranulozytose mit der Darreichung dieser Medikamente in Zusammenhang stehen könnte. Das ist ganz unwahrscheinlich, denn im Experiment haben sehr hohe Dosen niemals zum Bild der Agranulozytose geführt, hingegen ist die Agranulozytose eine fast regelmäßige Begleiterscheinung schwerer Infektionen überhaupt, besonders der Streptokokkeninfektionen, und auch bei unbehandelten Tieren fast in der Regel zu beobachten, wie ich durch Untersuchungen des Blutes und des Knochenmarkes solcher Tiere zeigen konnte. Denkbar wäre es, daß bei falscher Indikationsstellung das Auftreten einer Agranulozytose begünstigt werden könnte, da bei Anwendung dieser Mittel gegenüber Keimen, bei denen diese Substanzen nur ungenügend wirken, ein Abfall der Leukozyten eintreten könnte. In solchen Fällen könnte es vorkommen, daß Leukozyten unter der Prontosilwirkung die Keime zwar angreifen, aber nicht vernichten können und nun selbst zugrunde gehen. Auch bei zu geringer Dosierung bei an sich richtiger Indikation könnte es bei zu langer Fortsetzung dieser unvollkommenen Therapie aus denselben Gründen zu einem unerwünschten Abfall der Leukozyten kommen.

Die nach starker Ueberdosierung von Uliron und dem Diseptalen beobachteten Nebenwirkungen dürften sich bei Einhaltung der vorgeschriebenen Dosierung stets vermeiden lassen. Bei dem Auftreten von Exanthemen und anderen Ueberempfindlichkeitsreaktionen soll die Behandlung abgesetzt werden. Insbesondere wird der behandelnde Arzt auf beginnende neuritische Symptome bei solchen Patienten zu achten haben, bei denen durch Mißbrauch von Alkohol, Nikotin und anderen Ursachen, besonders Vitamin B_1-Mangel, mit einer Disposition zu rechnen ist.

Betrachtet man den heutigen Stand der Chemotherapie der bakteriellen Infektionen, so kann man sagen, daß fraglos ein Fortschritt erreicht ist, der vor wenigen Jahren noch als unerreichbar galt. Es darf erwartet werden, daß bei weiterer experimenteller und klinischer Erforschung dieses Gebietes noch wichtige neue Erkenntnisse erzielt werden können, die sich zum Segen für den erkrankten Menschen auswirken werden.

Die Therapie mit diesen neuen Medikamenten darf nicht zu einer kritiklosen, schematischen Anwendung führen, sondern in jedem einzelnen Fall wird es auch hier der Kunst des Arztes überlassen bleiben müssen, optimale Erfolge durch eine richtige Dosierung zu erzielen; die angegebenen Vorschriften können nur als allgemeine Richtlinien angesehen werden.

Ausgangspunkt für unsere Untersuchungen waren anatomische Beobachtungen über den Ablauf verschiedener bakterieller Infektionen, die dann mit den Methoden der Bakteriologie gesichert und erweitert wurden und schließlich zu praktischen Ergebnissen führten durch die Mitarbeit erfahrener Chemiker, ohne die die geleistete Arbeit undenkbar gewesen wäre. Die erzielten Ergebnisse sind wiederum ein Beweis dafür, daß sich immer neue

Arbeitsgebiete eröffnen, wenn sich benachbarte Disziplinen die Hand zu gemeinsamer Arbeit reichen. Erst als wir die bei Infektionskrankheiten auftretenden Vorgänge in ihren Zusammenhängen betrachteten und erfaßten, nicht nur mit den Augen einer isolierten Reagenzglas-Bakteriologie und Chemie, nicht nur mit den Augen des allein morphologisch orientierten Anatomen, traten die Erfolge ein. Weitere Fortschritte werden m. E. hauptsächlich durch Hineinbeziehung der Methoden der physiologischen Chemie und der Fermentforschung zu erwarten sein, dann, wenn wir Genaueres über die Stoffwechseleigentümlichkeiten der Bakterien erfahren.

29. J. Bürgers (Königsberg/Pr.):

Ueber den Wirkungsmechanismus von Prontosil und ähnlichen Substanzen [1]).

Viele englische und amerikanische Autoren führen die therapeutische Wirkung von Prontosil und ähnlichen Substanzen auf eine bakterizide oder wachstumshemmende Kraft zurück, welche besonders dem einfachen Sulfonamid (Prontosil album) zukomme. Namentlich aus Prontosil rubr. werde im Körper Sulfonamid abgespalten, und nur dieses habe bakterizide Wirkung. Ich habe bereits in einer früheren Arbeit ausgeführt, daß, abgesehen von vielen anderen Gegengründen, diese Ansicht nicht stimmen könne, da es mir in zahlreichen Versuchen nicht gelang, eine echte Bakterizidie nachzuweisen. Demgegenüber ist mir der Vorwurf gemacht worden, ich hätte keine einzelnen Protokolle angeführt. Ich werde auch heute absichtlich keine Einzeldaten geben, zumal unsere Untersuchungen viel zu umfangreich sind. Das geht daraus hervor, daß in den letzten 2½ Jahren in meinem Institut über 4500 Gußplatten zum Studium der Bakterizidie von Prontosil gemacht wurden. Ich glaube nicht, daß — abgesehen von Herrn Domagk — irgendein Autor so viele Versuche gemacht hat.

Die Technik, welche die einzelnen Autoren angewandt haben, um die Wirkung in vitro zu studieren, ist äußerst vielgestaltig, was einen Vergleich äußerst erschwert. Wrightsche Kammer, Kapillaren mit und ohne Umdrehung (Todds Apparat), Verdünnungsmethode, Gußplatten mit verschiedensten Nährböden, Abimpfung von flüssigen Medien ohne und mit verschiedenen Mengen Prontosil auf feste Nährböden, verschiedene Abimpfungszeiten, das alles wechselt in bunter Reihenfolge. Zu der in englisch sprechenden Ländern so beliebten Kammermethode muß endlich mal ein ernstes Wort gesprochen werden. Diese subtile Technik täuscht eine Exaktheit vor, die sie gar nicht hat, ja gar nicht haben kann. Zum Beweise folgendes:

1. Ist der Schluß auf Bakterizidie des Blutes oder der chemischen Zusätze bei Beobachtung von geringer Koloniebildung oder fehlender Koloniebildung ein voreiliger. Dieser Fehler betrifft im übrigen alle Methoden, ist also nicht auf die Kammer beschränkt. Wir stellen lediglich fest, daß nach 24 Std. weniger Kolonien entstanden sind als in der sofort angelegten Gußplatte,

---

1) Aus dem Hygienischen Institut der Universität Königsberg (Direktor: Prof. Dr. J. Bürgers).

oder daß nach 24 Std. gar keine Kolonien zu sehen sind. Ueber die Gründe für diese Erscheinung sagt die Methode nichts. Diese können aber verschiedenster Natur sein. Vergleicht man die Kolonienzahl einer Mischung von 60 oder 90 cbmm Blut mit 10 cbmm Strept. B.K. sofort zur Gußplatte mit der Koloniezahl, die man nach Anlegen der Kammer und gründlichem Abspülen der Kammer nach 5 Min., 1 Std., 8 Std. oder 24 Std. zur Gußplatte erhält, so ist die Koloniezahl in der Kontrollplatte immer höher. Dasselbe ist der Fall, wenn man die Kammer mit Menschenblut richtig bebrütet und nach 24 Std. die Kammerkolonien auszählt. Viele Protokolle, wie z. B. von Finklestone-Sayliss, Paine und Patrik zeigen das auch deutlich. Dabei ist es sehr schwer, ein Menschenblut vom Gesunden oder Kranken zu finden, das nicht selbst (ohne Prontosilzusatz) eine gewisse Abnahme der Kolonien aufweist. Zum Teil liegt das in folgendem begründet; und damit kommen wir zum zweiten wichtigen Punkt.

2. Eine Streptokokkenkolonie entsteht niemals aus einem Kokkus, es hängt vom Stamm bzw. von seinem Wachstum in Serumbouillon bzw. der Behandlung dieser vor Gebrauch ab, ob eine Kolonie aus 3 oder 10—20 Kokken entsteht. Dadurch können natürlich große Unterschiede entstehen. Wir haben in der letzten Zeit unsere Kulturen deswegen mehrere Stunden mit Glasperlen geschüttelt und uns vor Gebrauch davon mikroskopisch überzeugt, daß die Flüssigkeit nur Ketten von 2—6 Gliedern enthielt. Versuche, welche diesen Punkt nicht berücksichtigen, verlieren an Beweiskraft.

3. Soviel ich aus der Literatur ersehe, hat sich kein Mensch Gedanken gemacht, was aus den eingesäten Kokken im Blut wird. Beobachtet man nun solche Kammern mit Blut oder aktiviertem oder inaktiviertem Serum oder Serumbouillon beschickt, teils direkt, teils in Ausstrichen, so kann man feststellen, daß nach verschiedener Zeit, spätestens aber nach 3 Std. sehr viele Ketten zu Haufen agglutiniert sind. Eine Kolonie entsteht also sehr häufig aus einem solchen Agglutinationshaufen. Diese Agglutination fehlt in Serumbouillon und meist auch im inaktivierten Serum. Eine gegen die Kontrolle geringere Koloniezahl beweist also noch lange keine Bakterizidie.

4. Es hängt von der Stärke der Phagozytose und dem Schicksal der Kokken in den Leukozyten ab, ob sie noch auswachsen können oder nicht.

5. Wechselnde Stärke der Leukozytenfermente und der Gasspannung in der Kammer bilden unsichere Faktoren.

Punkt 3 und 4 erklärt zum Teil die Beobachtung von Maegraith u. Vollum, daß beim Fehlen von Leukozyten Bakterizidie durch Prontosil nicht einträte, was übrigens von sehr vielen Autoren bestritten wird.

6. Tritt in der Kammer keine Hämolyse ein, so ist die Bestimmung der Kolonienzahl schwer. Schließlich ist Koloniezahlabnahme bzw. scheinbare Sterilität nach 24 Std. noch kein sicherer Beweis einer Abtötung. Gerade unsere Versuche der letzten Monate haben uns gezeigt, daß eine nach 24 Std. steril aussehende Blutplatte nach 48 Std. oder 72 Std. wieder Kolonien aufweisen kann.

7. Prüft man Blut von Patienten vor und nach Behandlung mit Prontosil und stellt eine außergewöhnliche Verstärkung der scheinbaren Bakterizidie im Kammerversuch fest, so weiß man nicht, was auf vermehrter Agglutinationskraft, Bakterizidie oder Phagozytose einerseits, Wirkung von Prontosil andererseits zu beziehen ist.

8. Prüft man ein solches Blut einerseits mit der Kammertechnik, andererseits mit Entnahme kleiner Mengen zur Gußplatte oder gänzlicher Verarbeitung zur Gußplatte, so fällt immer wieder die Diskrepanz der Ergebnisse auf.

Nach dem Gesagten erscheint es verständlich, daß ich der Kammermethode im Lauf der letzten Jahre immer mehr mißtrauisch gegenüberstehe. Es muß ja auch gefordert werden, daß gleiche Ergebnisse mit andern Methoden erzielt werden müssen, wenn man gleiche Gasspannung anwendet.

Was ergeben nun andere Methoden? Zunächst ist es auffallend, daß die sonst in der Desinfektionstechnik angewandten Methoden bei Prontosil und Derivaten fast restlos versagen. Wenigstens ist in Serumbouillon eine bakterizide Wirkung fast nie vorhanden. Nur wenn man viele Passagen folgen läßt, kommt es ganz selten vor, daß ein Streptokokkenstamm plotzlich das Wachstum einstellt. Mit Uliron 1 : 10000 ist ein Abreißen schon eher möglich, sogar schon nach der zweiten Passage. Auf Agar + Pr. alb. oder Uliron 1 : 1000—1 : 10000 kann man nach 7 Passagen höchstens zartes Wachstum und geringe Abnahme der Hämolyse beobachten. Auf frischen Blutplatten tritt diese aber sofort wieder ein. Pneumokokken wachsen in Serumbouillon + Pr. alb. auch in Passagen unbehindert, reißen aber bei Zusatz von Uliron (sogar 1 : 30000) bald ab. Coli ist ganz refraktär, obwohl die Therapie hier gute Erfolge hat (60 Stämme aus Urin geprüft). Dabei ist zu betonen, daß der p_H solcher Nährböden ganz minimal nach der alkalischen Seite zu verschoben ist, also keine Rolle spielen kann. Ganz anders ist das Bild bei Meningokokken und Gonokokken. Diese wachsen auf solchen Nährböden selbst bei geringen Prontosilzusätzen (1 : 10000) nicht oder schlecht. Ausnahmen kommen vor, haben aber keine feste Parallele zum Erfolg der klinischen Therapie. Dasselbe gilt auch für Prontosilderivate. Es ist unwahrscheinlich, daß in Nährböden Sulfonamid abgespalten wird.

Die Verarbeitung von 0,1 ccm zur Gußplatte, entnommen aus 1 ccm Blut + 0,1 ccm verschiedener Prontosilverdünnungen sofort oder nach 2 Std., 4 Std., 8 Std., 24 Std. ergab mir in Hunderten von Versuchen fast nie Bakterizidie, ganz gleichgültig, ob die Streptokokkeneinsaat groß oder klein war, oder ob das Blut von Gesunden oder behandelten Kranken stammte. War eine Keimabnahme vorhanden, so zeigte sie auch das Blut ohne Prontosilzusatz. Dabei wurden die Röhrchen vor Entnahme kräftig geschüttelt. Zur Gußplatte wurden entweder Levinthal- oder Blutagar verwandt. Impft man aus solchen Gemischen 0,1 ccm zu verschiedensten Zeiten auf Blutplatte ab, so erhält man immer Wachstum, gleichgültig, ob die Röhrchen Pront. alb., Pront. S. oder Uliron enthalten. Nimmt man aber statt Blut einen Rindermilz-Kochsalzextrakt, so bleibt sowohl bei hämolytischen als auch bei Viridans-Stämmen gelegentlich das Wachstum aus. Prontosilfeste Stämme im Mäuseschutzversuch geprüft, konnten wir bei diesen und andern Methoden nie gewinnen. Dieser fast immer negative Erfolg veranlaßte mich auch in meiner früheren Arbeit zu der scharf ablehnenden Stellung gegen die Theorie von Colebrook. Analoge Versuche haben wir mit über 60 verschiedenen Colistämmen in Bouillon gemacht und die Versuche auch auf Bouillonpassagen ausgedehnt, wobei die Bouillon Prontosil album 1 : 1000—1 : 10000 enthielt. Niemals ergab sich eine klare Keimabnahme, obwohl doch durch hundertfache klinische Beobachtung bekannt ist, wie gut Prontosil bei Colizystitis wirkt. Im Gegensatz zu andern Autoren erwies sich auch der Urin von Patienten, welche viel Prontosil (30 Tabletten) erhalten hatten, nicht als bakterizid.

Als nun Domagk über Beeinflussung von Streptokokkenwachstum in vitro und die dabei angewandte Technik berichtete, haben wir die gleichen Versuche angestellt und dabei folgende merkwürdige Beobachtung gemacht.

1. Sehr wenige Stämme von hämolytischen Streptokokken zeigen eine mehr oder weniger starke Behinderung des Wachstums (Auftreten von Zwerg-

kolonien) bis zur scheinbaren Sterilität. Eine Beziehung zur Virulenz oder Therapie im Mäuseschutzversuch besteht nicht.

2. Es ist gleichgültig, ob Prontosil von Anfang an dem Blut zugesetzt wird oder nach 1 Std. Prontosil der Gußplatte zugegeben wird. Prontosil und in gleicher Weise seine Derivate behindern also in der Blutagargußplatte das Wachstum. Es kommt also wohl auf die Prontosilkonzentration im Agar an, die Wirkungsbreite geht bis 1 : 50000. Bei unserer oben geschilderten Technik war also die Konzentration im Agar zu gering. So erklären sich vielleicht die verschiedenen Angaben über Bakteriostatik in der Literatur.

3. Beobachtet man solche Gußplatten nach 48 Std. und 72 Std. weiterem Aufenthalt im Brutschrank, so erlebt man, daß auf vorher steril erscheinenden Platten Streptokokkenkolonien entstehen, oder daß die Zahl der Kolonien zunimmt. (Als Beweis siehe Tabelle I.) Die Deutung dieses Phänomens ist sehr schwer, Hypothesen erscheinen mir verfrüht.

Tabelle I.

1 ccm defibrin. Blut von nichtbehandelten Patienten wird mit 0,1 ccm verdunnt. Str. B. K. versetzt. Serie A erhalt als Zusatz sofort 1 mg Prontosil. Der Serie B wird 1 mg Prontosil erst ins Agar beim Gießen der Platten zugegeben, sie stand also vorher nicht unter Prontosilwirkung. Ablesung der Platten nach 24 und 48 Std.

Streptoc. haemolyt.	Ablesung nach	Prontosil album					Uliron			Serie A		Serie B
		Kontrollen		Serie A		Serie B	Serie A		Serie B			
		Einsaat	nach 1 Std.	sofort	nach 1 Std.	nach 1 Std.	sofort	nach 1 Std.	nach 1 Std.	sofort	nach 1 Std.	nach 1 Std.
2551	24 Std.	6 300	110	5 800	6	0	5100	5	0	8	0	3
	48 „	6 300	1500	6 [illegible]00	860	1200	5470	1100	1700	5 600	5 350	6 800
2559	24 Std.	9 800	5100	8 000	84	90	2800	1100	1800	13 000	12 100	9 300
	48 „	10 900	6000	10 000	5800	4100	6300	1800	2400	14 800	13 500	11 300
907	24 Std.	700	640	10	0	5	320	30	40	20	30	38
	48 „	1 700	1500	200	0	80	320	136	90	200	320	210
122	24 Std.	5 [illegible]00	2200	14	4	2	2	5	5	128	40	6
	48 „	7 [illegible]00	8100	6 200	5100	3400	6600	5700	6200	480	200	140

4. Die Tatsache, daß auch Uliron und Diseptale oder Prontosil rubr. ähnliche Wachstumsbehinderung ergeben, spricht wieder gegen die Theorie, daß Sulfonamid allein der wirksame Faktor sei. Verdünnt man 1 ccm Blut 1 : 2—1 : 20, so ist der bakterizide Effekt von Prontosil fast genau so, wie bei Verwendung von konzentriertem Blut. Es kommt nur darauf an, daß der ganze Inhalt zur Platte verarbeitet wird. Auch bei dieser Versuchsanordnung enthält die „sofort"-Prontosilplatte eine ganz geringe Kolonienzahl gegenüber den zahlreichen der Kontrollplatte. Nach 48 Std. wachsen aber Kolonien auf der „sofort"-Platte aus (siehe Tabelle II). Obwohl Viridans-Infektionen therapeutisch schwer beeinflußbar sind, kann man im Reagenzglas eine starke Wachstumsbehinderung durch Prontosil und verwandte Körper mit der oben beschriebenen Methode glatt demonstrieren.

Leider konnten wir die Angabe von Levaditi, daß die Kapselbildung durch Prontosil verhindert werde, bis auf den heutigen Tag nicht bestätigen.

Daß Prontosil in Streptokokken eindringt, kann man chemisch beweisen. Dabei scheint nach Versuchen von Lodenkämper in meinem Institut die

Tabelle II (abgekürzt).

	0,8 ccm Menschenblut + 0,1 ccm Str.B.K. verdünnt			
	a) + Pront. alb. 0,1 ccm 1 : 1000		b) + 0,1 ccm NaCl	
	Gußplatte sofort	nach 10 Std.	Gußplatte sofort	nach 10 Std.
1. Blut konz.	2/800*	1	990	1250
2. „ 1 : 2 verd.	1/1100*	0	1100	1060
3. „ 1 : 3 verd.	1/1. 00*	0	1080	10 0
4. „ 1 : 4 verd.	1/1250*	0	980	2100
5. „ 1 : 5 verd.	2/1050*	0	935	7580
6. „ 1 : 10 verd.	2/1060*	0	1120	∞
7. „ 1 : 15 verd.	2/1070*	0	1200	∞
8. „ 1 : 20 verd.	2/780*	0	2000	∞

*) Die Zahl vor dem Strich bedeutet die Koloniezahl, gezahlt nach 18 Std. bei 37°, die Zahl nach dem Strich Ablesung nach 48 Std. Aufenthalt bei 37°.

Anwesenheit von Cholesterin das Eindringen von Prontosil in die Streptokokken zu begünstigen.

Unsere bereits früher mitgeteilten Versuche über Hautreaktionen nach Injektion von vorbehandelten Streptokokken haben wir nach verschiedenen Richtungen erweitert und können heute folgendes sagen: Hämolytische Streptokokken, welche einige Stunden in Serumbouillon der Wirkung von Prontosil Konzentration 1 : 1000—10000 ausgesetzt und in bestimmter Menge $^1/_5$—$^1/_{20}$ Bodensatz intrakutan bei Kaninchen injiziert werden, ergeben nur eine minimale bis geringe Infiltration und Rötung, während die Kontrolle bei dem gleichen Tier schwere, oft diffuse Eiterung bis zur Phlegmone oder starke Nekrose macht. Als Einwirkungszeit ist eine Dauer von mindestens 6 Std. notwendig. Ausnahmen sind sehr selten. Derselbe Versuch mit Viridans oder Mundstreptokokken gelingt nicht, d. h. die Erscheinungen an der Haut sind dieselben wie bei der Kontrolle. Dabei sind diese Stämme wenig oder gar nicht mäusepathogen. Worauf dieser Unterschied beruht, ist schwer erklärbar. An der Bakterienmenge allein kann es nicht liegen, vielleicht verhindert ein anderer Fett- oder Kohlehydrataufbau bei den Viridansstämmen die Wirkung des Prontosils in den Streptokokken.

Der Versuch geht in gleicher Weise mit Pront. rubr. Uliron usw., allerdings scheint Uliron auch Viridans zu beeinflussen[1]).

Auf jeden Fall reichen alle bisher genannten Reagenzglasversuche nicht aus, den Wirkungsmechanismus zu erklären. Neben einer bei verschiedenen Streptokokkenstämmen sehr stark variierenden Wachstumsbehinderung ist es in der Hauptsache wohl eine Behinderung der Giftbildung, das schnelle Erscheinen von Phagozyten, dementsprechend bei Hautversuchen die schnelle Abkapselung des Herdes, die beschleunigte Freßtätigkeit der Leukozyten, die man allerdings im Reagenzglas nicht beweisen kann, und die Selbstimmunisierung des Körpers, welche den therapeutischen Effekt ergeben.

1) Inzwischen konnten wir feststellen, daß bei sehr langer Berührung auch Viridans beeinflußt wird, ferner, daß der Fettgehalt von hämolytischen Srreptokokken sehr viel hoher ist, als derjenige von Viridans. Infolgedessen ist bei hämolytischen Stämmen auch die Absorption von Prontosil nachweisbar eine schnellere.

30. H. Schlossberger und F. Bär (Berlin):

Untersuchungen über die Wirkungsweise von Sulfonamidverbindungen bei der Infektion von Mäusen mit Streptokokken und Lymphogranuloma inguinale [1]).

Die meisten Autoren, welche sich mit der Frage der Wirkungsweise der Sulfonamidverbindungen bei Streptokokken- und anderen bakteriellen Infektionen beschäftigt haben (Domagk, Colebrook u. Mitarbeiter, Levaditi, Bürgers, Felke, Long u. Bliss u. a.) sind sich darin einig, daß der Heilwert der genannten Verbindungen weniger in einer Abtötung, sondern in erster Linie in einer Entwicklungshemmung der betreffenden Erreger zu suchen ist. Maßgebend waren für diese Stellungnahme vor allem die Ergebnisse von in-vitro-Versuchen, die zwar eine stark wachstumshemmende, aber nur eine sehr geringgradige abtötende Wirkung der Sulfonamidverbindungen ergeben hatten. Von Interesse sind in diesem Zusammenhang insbesondere auch die Angaben von Levaditi u. Vaisman, nach denen durch diese Schwefelderivate des Benzols die Fähigkeit — besonders der Streptokokken — zur Kapselbildung gehemmt oder aufgehoben wird. Danach hätte man sich also vorzustellen, daß der Wirkungsmechanismus bei der Heilung einer Streptokokken-, Gonokokken- usw. Infektion durch Prontosil, Uliron und ähnliche Präparate in der Weise zustande kommt, daß zunächst das Mittel eine Schädigung und Wachstumshemmung der Erreger bewirkt und daß dann die in ihrer Vitalität lädierten Keime den spezifischen Abwehrmaßnahmen des Organismus, vor allem der Phagozytose, anheimfallen. Wir hätten es also hier mit einem ähnlichen Prozeß zu tun, wie bei der Wirkung des Germanins auf Trypanosomen, die durch das Harnstoffderivat nach den Befunden von v. Jancsó eine Schädigung ihres Kohlenhydratstoffwechsels und dadurch eine Einbuße ihrer Widerstandsfähigkeit erleiden und dann phagozytiert werden.

Um nun diese Auffassung hinsichtlich des Wirkungsmechanismus der in Rede stehenden Präparate, besonders gegenüber Streptokokken, weiterzuverfolgen, um insbesondere die Angaben von Levaditi u. Vaisman hinsichtlich der Verhinderung der Kapselbildung durch Prontosil und ähnliche Verbindungen zu prüfen, haben wir im Institut Robert Koch eine Anzahl von Versuchen ausgeführt, über deren Ergebnis wir hier ganz kurz berichten möchten.

Wir gingen dabei von der erstmals von Miller u. Castles festgestellten Tatsache aus, daß bestimmte, für Tiere nicht pathogene Erreger menschlicher Erkrankungen — vor allem Meningokokken — dann, wenn man sie Mäusen mit Muzin einverleibt, tödliche Septikämien hervorrufen. Diese Erscheinung beruht offenbar darauf, daß die Meningokokken durch die zu den Eiweiß-

1) Aus der Abteilung für experimentelle Therapie des Instituts Robert Koch (Abteilungsdirektor: Prof. Dr. H. Schlossberger).

körpern gehörige kolloidale Substanz vor der Einwirkung der Abwehrmaßnahmen des Organismus geschützt sind. Es ließ sich nun zeigen, daß bei Mäusen durch das Muzin auch eine Beeinflussung der Streptokokkeninfektion bewirkt wird, die darin besteht, daß Erregermengen, die an sich nicht mehr krankmachend wirken, bei gleichzeitiger Injektion von Muzin eine tödlich verlaufende Erkrankung hervorrufen. Vor allem aber zeigte sich auch, daß bei Mäusen, denen kurz nach der Streptokokkeninfektion Muzin intraperitoneal eingespritzt wurde, die Prontosilderivate keine Heilwirkung zu entfalten vermögen (s. Tabelle I).

Tabelle I.

Hemmender Einfluß des Muzins auf die Prontosilwirkung.

Infektion: am 1. 4. 38 ip. mit je 0,5 ccm 1/500 24stünd. Serumbouillonkultur „Streptokokkus Krüger". In Reihe b) sofort nachher ip. je 0,5 ccm 5proz. Muzin (reinst, Nordmarkwerke).

Behandlung: einmalig nach 1 Std. sk. mit Prontosil album.

a) Maus 1	Prontosil album 1/20	überlebt
„ 2	„ „ 1/40	†$_3$
„ 3	„ „ 1/80	†$_2$
b) Maus 4	Mucin + Prontosil album 1/20	†$_2$
„ 5	„ + „ „ 1/40	†$_2$
„ 6	„ + „ „ 1/80	†$_1$
c) Maus 7	Kontrolle unbehandelt	†$_2$

†$_2$ bedeutet Tod am 2. Tage nach Infektion.

Diese hemmende Wirkung des Muzins ist nun aber, wie die weiteren Versuche erkennen ließen, nicht auf die Prontosilderivate beschränkt, vielmehr ergab sich, bei der geschilderten Versuchsanordnung, daß auch das bei der Streptokokkeninfektion der Maus sonst sehr gut wirksame Goldpräparat Aurodetoxin durch vorherige Anwendung des Muzins an der Ausübung seiner therapeutischen Wirksamkeit verhindert wird (s. Tabelle II).

Tabelle II.

Versuch mit Auro-Detoxin.

Infektion: mit je 0,5 ccm 1/100000 24stünd. Serumbouillonkultur „Streptokokkus Aronson", in Reihe b) sofort nachher 0,5 ccm Muzinlosung.

Behandlung: nach 1 Std. sk. mit Auro-Detoxin „H 308" (Wülfing).

a) Maus 1	Auro-Detoxin 1/30	überlebt
„ 2	„ „ 1/60	„
„ 3	„ „ 1/120	†$_2$
b) Maus 4	Mucin + Auro-Detoxin 1/30	†$_2$
„ 5	„ + „ „ 1/60	†$_3$
„ 6	„ + „ „ 1/120	†$_2$
c) Maus 7	Kontrolle unbehandelt	†$_2$
„ 8	„ „	†$_2$

Vor allen Dingen zeigte sich aber, daß dieselbe hemmende Wirkung des Muzins auch gegenüber dem Streptokokkenserum zu verzeichnen war (siehe Tabelle III).

Die geschilderte Erscheinung, welche wohl ein Analogon zu dem erstmals von Browning u. Gulbransen bei Trypanosomen und von Bau bei Rekurrens- und Syphilisspirochäten beobachteten Interferenzphänomen darstellt, ist offenbar nur so zu erklären, daß die Streptokokken durch das kurz

Tabelle III.
Versuch mit Serum.

Infektion: mit je 0,5 ccm 1/100000 24stünd. Serumbouillonkultur „Streptokokkus Aronson", in Reihe b) sofort nachher 0,5 ccm Muzinlösung.
Behandlung: nach 1 Std. iv. mit Antistreptokokkenserum Aronson (Schering-Kahlbaum Nr. 69).

a) Maus 1	Serum 1/5	überlebt	b) Maus 4	Muzin + Serum 1/5	$\dagger_1$
2	„ 1/50	$\dagger_2$	5	„ + „ 1/50	$\dagger_2$
3	„ 1/500	$\dagger_2$	6	„ + „ 1/500	$\dagger_2$
c) Maus 7	Kontrolle unbehandelt	$\dagger_2$			

nach der Injektion dem Körper zugeführte Muzin vor der Einwirkung des Chemikales bzw. der spezifischen Antikörper geschützt werden. Wir haben hier also sichtlich einen eindeutigen Beweis für die direkte Beeinflussung der Streptokokken durch die Prontosilderivate vor uns, da diese ja in derselben Weise wie die Streptokokkenantikörper an ihrer Wirkung gehindert werden. Darüber, daß die Streptokokkenantikörper ohne Muzin von den Streptokokken verankert werden, dürfte ja wohl ein Zweifel nicht bestehen.

Was weiterhin die Wirkungsweise der Prontosilderivate beim Lymphogranuloma inguinale (L. i.) anlangt, so wurde bereits auf Grund der Ergebnisse mit Prontosil album von uns darauf hingewiesen (Bär), daß es sich hierbei anscheinend auch nur um eine Entwicklungshemmung der Erreger handelt. Maßgebend hierfür war die Beobachtung, daß die Mehrzahl der mit dem genannten Präparat behandelten Mäuse nicht geheilt wurde, daß es vielmehr zu einem im Vergleich mit den Kontrollen allerdings wesentlich verzögerten Auftreten von Krankheitserscheinungen kam und die Tiere daran zugrunde gingen. Die weiteren Untersuchungen in dieser Richtung zeigten, daß zwar manche Schwefelderivate des Benzols (Diseptal B, Prontosil, Septazin, Rodilon, M. u. B. 693), vor allem das als Uliron bezeichnete [p-Aminophenylsulfonamido]-phenyldimethylsulfonamid eine wesentlich stärkere Heilwirkung bei der experimentellen L. i.-Infektion der Maus entfalten und daß es durch mehrfache Behandlung der infizierten Mäuse mit diesen Substanzen gelingt, in einem hohen Prozentsatz klinische Heilungen zu erzielen. In der nachfolgenden graphischen Darstellung (Tabelle IV) sind die bei der Prüfung einiger Präparate der Prontosilreihe erhaltenen Ergebnisse wiedergegeben. Zum Vergleich wurde hier auch eine vollkommen unwirksame Sulfonamidverbindung (P. 592) aufgeführt. Erwähnt sei noch, daß außer den genannten Substanzen sich auch noch weitere Verbindungen aus dieser Reihe bei der L. i.-Infektion der Maus als gut wirksam erwiesen haben; zu nennen sind hier insbesondere das von der Firma Merck hergestellte und als Ilvin bezeichnete Sulfanilsäure-4-acetoanilid (vgl. Tabelle V und VII) sowie das uns von Prof. Dr. Domagk zur Verfügung gestellte Präparat Kl. 1945, dessen Konstruktion uns nicht bekannt ist (vgl. Tabelle VII).

Durch Verimpfung der Gehirne solcher scheinbar geheilter Mäuse auf frische Mäuse konnte indessen nachgewiesen werden, daß trotz Fehlens von Krankheitserscheinungen eine Sterilisierung des Organismus durch die Prontosilderivate im allgemeinen nicht erreicht wird (vgl. Tabelle V).

Von Interesse ist dabei allerdings die mehrfach gemachte Feststellung, daß die Verimpfung der Gehirne der erfolgreich behandelten Mäuse auf frische Tiere bei diesen zwar zu Krankheitserscheinungen, aber nicht zum Tode führt. Diese Beobachtung ist offenbar nur durch die Annahme zu erklären, daß durch das chemische Mittel eine nachhaltige Schädigung des Erregers

Tabelle IV.

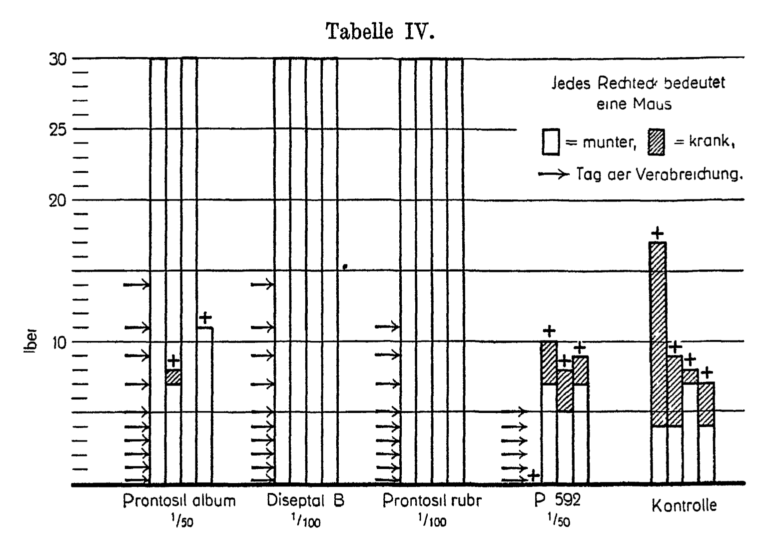


Tabelle V.
Ergebnis der Gehirnüberimpfung geheilter Mäuse.

	1. Gehirn nicht steril	2. verspätete Erkrankung und Tod	3. teilweise ohne Krankheitserscheinung	4. Gehirn steril
Infektion:	23. Nov. 1938 mit L. i. (Bley)	16. August 1938 mit L. i. (St)	3. Oktober 1938 mit L. i. (Bley)	26. Juli 1938 mit L. i. (St)
Behandlung: Dosis	Ilvin 1/50 (9mal)	Uliron 1/100 (15mal)	Ilvin 1/50 (9mal)	Diseptal B 1/100 (7mal)
„ letzter Tag	6. Dez. 1938	16. Sept. 1938	14. Oktober 1938	2. August 1938
Gehirnüberimpfung	am 40. Tag	am 4. Tag	am 21. Tag	am 43. Tag
nach letzter Behandlung an:	Maus	Maus	Maus	Maus
	1: kr_3 $†_4$ 2: kr_3 $†_7$ 3: lkr_3 kr_4	1: m_4 kr_7 $†_{20}$ 2: m_1 kr_7 $†_{15}$ 3: m_1 kr_7 $†_{77}$	1: m_3 kr_6 $†_{13}$ 2: m_3 m_6 m 3: m_3 m_8 m	1, 2, 3: dauernd munter

kr = krank; m = munter; $†_4$ bedeutet den Eintritt des Todes am 4. Tag nach Infektion.

bewirkt wurde, die nicht nur zu einer Hemmung seiner Entwicklung, sondern auch zu einer Herabsetzung seiner Virulenz geführt hat. Diese Abschwächung kann nach unseren Beobachtungen so weit gehen, daß sich bei den mit dem Gehirn der behandelten Mäuse infizierten, dann erkrankten, aber durchgekommenen frischen Mäuse durch Verimpfung ihres Gehirns kein Virus mehr nachweisen läßt. Diese Mäuse der 3. Passage müssen aber trotzdem zum Teil eine leichte Infektion durchgemacht haben; es wäre sonst nicht zu verstehen, daß 2 von 6 solchen Mäusen auf eine später erfolgte homologe Reinfektion hin keinerlei Krankheitserscheinungen aufgewiesen haben (siehe Tabelle VI).

In Uebereinstimmung mit den Befunden von MacCallum u. Findlay haben auch wir bei einem Teil der erfolgreich behandelten L. i.-Mäuse eine Immunität gegenüber einer nochmaligen Einverleibung des Virus feststellen

Tabelle VI.
Abschwächung der Virulenz des L.i.-Virus durch die chemotherapeutische Behandlung. — Ergebnis der Gehirnuberimpfungen und der Reinfektion.

Infektion: 16. August 1938 mit L. i. (Stendel)
Behandlung: Prontosil album 1/50 (15mal)
letzter Tag der Behandlung: 16. September 1938
1. Gehirnüberimpfung des geheilten Tieres 11 Tage nach Behandlung an Maus

	1	2	3	
	kr_6	lkr_6	kr_6	2. Passage
	$\dagger_{32}$	kr_9	kr_9	
2. Gehirnüberimpfung		m	m	40 Tage nach Behandlung

an Maus	1	2	3	4	5	6	3. Passage
	m	m	m	m	m	m	→ dauernd munter
Reinfektion mit L. i. (Stendel) → am 19. Dezember 1938	m	m	m	m	m	m	
	m_4	m_4	m_4	m_4	m_4	m_4	
	m	$\dagger_9$	m	$\dagger_9$	$\dagger_9$	$\dagger_8$	

Kontrolle:		
	kr_4	kr_4
	$\dagger_{22}$	$\dagger_{18}$

können. Diese Immunität äußerte sich bei der Mehrzahl der mit dem homologen oder einem heterologen Stamm reinfizierten Tiere in einem verspäteten Auftreten der Erkrankung und des Todes; einige Mäuse überstanden die Reinfektion ohne jegliche Krankheitserscheinungen. Bei anderen Tieren derselben Reihen waren dagegen keinerlei Anzeichen einer erworbenen Unempfindlichkeit nachzuweisen (s. Tabelle VII).

Tabelle VII.
Reinfektion erfolgreich behandelter L. i.-Mäuse.

	1. Keinerlei Anzeichen einer erworbenen Unempfänglichkeit.	2. Verspatetes Auftreten der Erkrankung und des Todes.	3. Die Tiere überstehen die Reinfektion ohne Krankheitserscheinung
Infektion:	27. Okt. 38 mit L. i. (St)	4. Okt. 38 mit L. i. (St)	23. Nov. 38 mit L. i. (Bl)
Behandlung:	**M. u. B. 693** 1 100 (4mal)	**Ilvin** 1/50 (8mal)	**Kl. 1945** 1/50 (7mal)
„ letzter Tag	5. Nov. 38	16. Sept. 38	6. Dez. 38
Reinfektion:	19. Januar 39	4. Nov. 38	16. Januar 39
	Maus 1 — 2	Maus 1 — 2	Maus 1 — 2 — 3
Ergebnis:	kr_4 — kr_4	m_6 — m_6	m — m — m
	$\dagger_{11}$ — kr	$\dagger_{18}$ — $\dagger_{43}$	dauernd munter
Kontrollen:	kr_4 $\dagger_5$ — kr_4 $\dagger_{12}$ — kr_4 $\dagger_6$ — kr_4 $\dagger_5$	kr_3 $\dagger_4$ — kr_3 $\dagger_{10}$ — kr_3 $\dagger_4$ — kr_4 $\dagger_{11}$	kr_3 $\dagger_4$ — kr_3 $\dagger_7$ — kr_3 $\dagger_7$ — kr_3 $\dagger_{10}$

Die Frage des Zustandekommens der Immunitätsvorgänge beim L. i. kann daher noch keineswegs als geklärt angesehen werden, wenn sich auch nach den bisher vorliegenden Resultaten mit ziemlicher Sicherheit sagen läßt,

daß die Ausbildung einer Unempfänglichkeit beim L. i. an das Ueberstehen einer leichten Infektion geknüpft ist. Nur beiläufig sei erwähnt, daß, nach einer Untersuchung von Dr. Cascos am Institut Robert Koch, durch Hitze oder Zusatz von 0,4proz. Formalin abgetötetes L. i.-Virus bei Mäusen keine oder keine ausreichende Immunität herbeizuführen vermag.

Zusammenfassend läßt sich also nach unseren Ergebnissen, die mit den Angaben zahlreicher anderer Autoren in Uebereinstimmung stehen, sagen, daß die Heilwirkung der Prontosilderivate sowohl bei der Streptokokken- als auch bei der L. i.-Infektion der Maus zweifellos nur in einer vorübergehenden Schädigung der Krankheitserreger beruht. Eine Heilung der Erkrankung tritt daher offenbar nur dann ein, wenn diese Beeinträchtigung der Erreger so lange anhält, bis der Organismus seine Abwehrmaßnahmen genügend entwickelt hat, und es dadurch zu einer endgültigen Vernichtung oder wenigstens zur Ausbildung eines Gleichgewichts zwischen Makro- und Mikroorganismus kommt. Unsere Beobachtungen stehen daher mit der Annahme, daß es sich beim chemotherapeutischen Heilungsprozeß um einen komplexen Vorgang, nämlich eine primäre Schädigung des Erregers durch das Chemikale und ein sekundäres Eingreifen des Organismus handelt, in guter Uebereinstimmung.

Schrifttum.

Bär, F., Zbl. Bakter. I Ref. **129**, 236 (1938); Klin. Wschr. **17**, 588 (1938). — Bau Kien-Hun, Z. Immun.forschg **90**, 482 (1937). — Browning, C. H., u. Gulbransen, R., J. of Path. **25**, 395 (1922). — Burgers, Dtsch. med. Wschr. **64**, 598 (1938). — Colebrook, L., Buttle, G. A. H., u. O'Meara, R. A. Q., Lancet **231**, 1323 (1936). — Domagk, G., Z. klin. Med. **132**, 775 (1937); Dermat. Wschr. **107**, 797 (1938). — Felke, H., Arch. f. Dermat. **178**, 152 (1938). — v. Jancsó, N., u. v. Jancsó H., Z. Immun.forschg **84**, 471 (1934/35). — Levaditi, C., Schweiz. Z. Path. u. Bakt. **1**, 365 (1938). — Levaditi, C., u. Vaisman, A., Presse méd. **1935**, 2097. — Long, P. H., u. Bliss, E. A., J. of Chemotherapy **14**, 31 (1937). — MacCallum, F. O., u. Findlay, G. M., Lancet **235**, 136 (1938). — Miller, C. P., u. Castles, R., J. inf. Dis. **58**, 263 (1936).

Aussprache.

Hammerschmidt (Graz)

hat die Frage der Prontosilwirkung durch subkutane Infektion der Mäuse mit Streptokokken in Agar, der als Nährboden dient und dabei leicht diffundierbar ist, bei gleichzeitiger regelmäßiger Behandlung mit Prontosil solubile untersucht. Dabei zeigt sich, daß beim behandelten Tier der Agarknollen, in dem sich die Kokken besonders reichlich in Körpernähe entwickeln, von einem dichten Leukozytenwall umgeben wird, den die Bakterien im allgemeinen nicht zu passieren vermögen. Wo dies doch erfolgt, z. B. bei ungenügender Behandlung, riegelt sofort ein neuer Leukozytenwall die Bakterien ab. Dabei kommt es zu keinerlei Phagozytose seitens der Leukozyten, wohl aber gehen die dem Agar und den Bakterien zunächst liegenden Leukozyten toxisch zugrunde, werden als Lamellen pyknotischer Kerne abgestoßen, aber sofort durch neu zuwandernde Leukozyten ersetzt, bis in der Tiefe gebildetes Bindegewebe den Abszeß dauernd abschließt. Im Gegensatz dazu dringen beim unbehandelten Tier die Streptokokken sehr bald hemmungslos in die Tiefe. Da nach diesen Befunden weder Phagozytose noch Bakterizidie an der Abwehr beteiligt sind, muß man andere Verteidigungswaffen annehmen, welche die Bakterien an sich nicht schädigen, sie aber am Eindringen in den Körper verhindern. Solche humorale, wahrscheinlich von den Leukozyten abgesonderte Stoffe würden am besten den Antiaggressinen nach der Vorstellung Bails entsprechen die hier aber nicht als Folge der Immunität entstanden wären, sondern unter dem Einfluß von Prontosil von den Leukozyten abgesondert würden. (Vorweisung mehrerer kolorierter Abbildungen.)

M. Gundel (Gelsenkirchen):

Manche der in diesem Vortrag angeschnittenen Fragen haben auch in unserm Institut bereits eine Bearbeitung erfahren, wobei ich insbesondere auf die Veröffentlichungen von Behrens und Osterholz hinweise. Nach unseren orientierenden Tierversuchen haben wir den Eindruck, daß sowohl bei der Meningitis epidemica als auch bei der Bangschen Infektion eine kombinierte Sero- und Chemotherapie günstigere Erfolge erwarten laßt, als die alleinige Anwendung von Serum oder Chemotherapeutikum. Durch Herrn Wüstenberg lassen wir in jedem Fall einer neuen von uns diagnostizierten Meningitis epidemica die Verbindung mit dem behandelnden Arzt aufnehmen und empfehlen ihm, diese kombinierte Therapie mit Meningokokken-Heilserum und Prontosil bzw. Uliron vorzunehmen. Das gleiche gilt für die Bangsche Erkrankung durch kombinierte Vakzine- und Prontosiltherapie. Das Material wird laufend von uns kritisch bearbeitet und wir haben den Eindruck, daß die Heilungsaussichten verbessert werden.

Ausgehend von unseren Untersuchungen über die Chemotherapie der experimentellen Pneumonie haben wir das neue Präparat der Nordmarkwerke in Hamburg, das Eubasin, versucht, und einige günstige Ergebnisse erhalten. Die Versuche sind noch nicht abgeschlossen. Wir möchten aber glauben, daß die Weiterarbeit an den Derivaten des Prontosil auch zu Präparaten führen wird, die ähnlich wie die Streptokokken- auch die Pneumokokkeninfektionen des Menschen günstig beeinflussen wird.

K. Kißkalt (München):

Da zahlreiche Kurven von Herrn Bär die Mäuse nach „krank" und „munter" unterscheiden, möchte ich fragen: Nach welchen klinischen Symptomen wird festgestellt, ob eine Maus krank ist? Gesträubte Haare, verklebte Augen können bis zum Tode fehlen; die Nahrungsaufnahme der Beobachtung entgehen. Objektiv feststellbar ist oft Temperatursturz, der aber nicht mit dem „Mäusethermometer", sondern mit dem „Schabenthermometer" festzustellen ist.

Kikuth (Wuppertal-Elberfeld):

Die chemotherapeutische Wirkung des Uliron und anderer Präparate aus der Sulfonamidreihe bei Lymphogranuloma inguinale konnte bei uns von Dr. Gönnert voll und ganz bestätigt werden. Die chemotherapeutische Beeinflußbarkeit dieser Virusart ist deshalb so bemerkenswert, weil bisher Präparate aus der Sulfonamidreihe bei allen anderen Virusarten, bei denen sie geprüft werden konnten, versagt haben. Interessant ist deshalb in diesem Zusammenhang die neuerdings von Brumpt, Caminopetros und anderen Autoren aufgestellte Behauptung, daß das Virus von Lymphogranuloma inguinale zu der Gruppe der Rickettsien gerechnet werden sollte. Für einen solchen Fall ist der Name Rickettsia lymphogranulomatosis bzw. Miyagawanella vorgeschlagen worden. Ohne zu dieser Theorie näher Stellung zu nehmen, möchte ich Sie darauf aufmerksam machen, daß auch das Trachom, nach neuen Anschauungen gleichfalls durch eine Rickettsienart hervorgerufen, sich ebenfalls durch Sulfonamidpräparate therapeutisch in günstigem Sinne beeinflussen läßt. Nach den Untersuchungen von Neitz in Südafrika wird nun auch das durch Rickettsia ruminantium hervorgerufene Herzwasser der Schafe, Ziegen und Rinder, bei dem unbehandelt die Mortalität 60—80 Proz. betrug, durch Uliron fast ausnahmslos geheilt. Die Mortalität bei 41 von Neitz mit Uliron behandelten Schafen betrug 4,9 Proz. im Vergleich zu 70 Proz. bei den Kontrolltieren.

J. Bürgers (Königsberg/Pr.) Schlußwort.

Bär (Berlin) Schlußwort):

Zu der Anfrage von Herrn Kißkalt ist zu bemerken, daß die intrazerebral mit der Gehirnaufschwemmung einer kranken Passagemaus infizierten unbehandelten Mäuse vom 3.—4. Tag ab unter den Symptomen einer Meningoenzephalitis (verklebte Augen, gekrümmte Haltung, zittrige Bewegungen) erkranken und im allgemeinen, wenn die Infektion stark genug ist, nach 5—10 Tagen eingehen.

Im Anschluß an die Bemerkungen von Herrn Kikuth läßt sich sagen, daß die Ergebnisse über die chemotherapeutische Beeinflussung anderer experimenteller Virusinfektionen durch die Verbindungen der Sulfonamidreihe bisher entweder negativ lauten oder weitere Untersuchungen notwendig machen. So konnten die günstigen Resultate von Rosenthal und Mitarbeitern (1937) mit Prontosil bei der experimentellen Infektion der Maus mit Choriomeningitisvirus von anderen Forschern (Ronse, Levaditi 1938) nicht bestätigt werden (vgl. auch McKinley, Meck u. Acree 1939). Die Berichte über Heilerfolge bei Hundestaupe mit Sulfonamidverbindungen sind im allgemeinen zufriedenstellend (Marcus

u. Necheles, Dochez u. Slanetz, Larsen 1938; s. auch Dickerson u. Whitney 1938). Von besonderem Interesse scheint in diesem Zusammenhang auch die Arbeit von Climenko, Crossley u. Northey (1938) zu sein, in welcher diese Forscher über eine günstige Beeinflussung der Maus, bei mäßiger Infektion mit menschlichem Influenzavirus, durch Verabreichung zweier Typen von Sulfonamidpräparaten, deren eine das Disulfanilamid ($H_2N-C_6H_4-SO_2-NH-SO_2-C_6H_4-NH_2$) und dessen N^1-Methyl- und Aethylderivat darstellt, berichten. Diese Feststellung bedarf jedoch noch einer Nachprüfung.

31. M. Rothermundt und K. Burschkies (Frankfurt a. M.):

Ueber neue Erfahrungen auf dem Gebiete der aromatischen Arsenverbindungen [1].

Bei der Bekämpfung der Infektionskrankheiten suchen wir einmal die Krankheitskeime in der Außenwelt zu vernichten, bevor sie mit Mensch und Tier in Berührung kommen, das andere Mal nach bereits erfolgter Infektion die Vermehrung der Parasiten im Organismus zu unterdrücken und den infizierten Körper von den Erregern zu befreien.

In den Phenolen, Kresolen, im Hydrochinon, Sublimat und anderen chemischen Substanzen besitzen wir wirksame Präparate, die noch in hohen Verdünnungen sogar die widerstandsfähigsten Krankheitskeime in kurzer Zeit in vitro abzutöten vermögen. Alle diese drastisch wirkenden Desinfektionsmittel haben jedoch bei der Behandlung der Infektionskrankheiten vollkommen versagt.

Der Chemotherapie fällt daher die Aufgabe zu, Stoffe ausfindig zu machen und neue Verbindungen herzustellen, die in vivo die Krankheitserreger abzutöten vermögen, ohne dabei lebenswichtige Organe ernsthaft zu schädigen oder den Organismus zu vergiften. — Ein brauchbares chemotherapeutisches Mittel muß daher bei maximaler Parasitotropie eine minimale Organotropie aufweisen.

So hat sich denn im Laufe der Zeit die Chemotherapie zu einer selbständigen naturwissenschaftlichen Disziplin entwickeln können. Unendlich viel Arbeit ist in den letzten 30 Jahren auf diesem Gebiete geleistet worden, viele tausende Verbindungen sind hergestellt und im Tierexperiment gegen die verschiedensten Infektionserreger geprüft worden. — Das praktische Resultat dieser gewaltigen Arbeitsleistung ist jedoch sehr bescheiden, die Ausbeute, d. h. Präparate, die sich in der Behandlung der Infektionskrankheiten wirklich bewährt haben, erschreckend klein. — Am deutlichsten tritt dies bei den organischen, aromatischen Arsenverbindungen in Erscheinung; nur einige wenige dieser Präparate, wie z. B. das Salvarsan und seine Derivate, oder von den Phenylarsinsäuren z. B. das Atoxyl, Spirozid und Tryparsamid konnten in den Arzneischatz aufgenommen werden.

Die Ursache für die vielen Mißerfolge dürfte wohl in unserer vorläufig mangelnden Kenntnis über das Schicksal der Präparate im Organismus, sowie in dem noch wenig geklärten Problem über die Beziehungen zwischen

---

1) Aus dem Forschungsinstitut für Chemotherapie Frankfurt a. M. (Direktor: Geh. Rat Prof. Dr. R. Otto).

chemischer Konstitution und biologischer Wirkung zu suchen sein. Zweifellos fällt der Konstitution eine wichtige Rolle für die Wirkung eines chemotherapeutischen Präparates zu, doch sind dafür auch noch andere Momente physikalischer und chemischer Natur verantwortlich zu machen.

Mit meinem heutigen Vortrag hoffe ich zur Klärung der Frage über die Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und biologischer Wirkung einen weiteren Beitrag zu bringen und Ihnen an Hand einiger experimenteller Versuche zeigen zu können, welchen Einfluß die verschiedenen Substituenten in der Aminogruppe der 3-Amino-4-oxy-phenylarsinsäure auf den Arsinsäurerest haben. Unsere Erfahrungen rühren aus einer gemeinsamen Arbeit von Herrn Dr. Burschkies und mir her, die wir im Laufe der letzten Jahre im Forschungsinstitut für Chemotherapie in Frankfurt a. M. ausgeführt haben.

Auf der 17. Tagung der Deutschen Vereinigung für Mikrobiologie in Berlin 1937 haben wir über Konstitution und Wirkung aromatischer Arsenverbindungen berichtet und darauf hingewiesen, daß keine allgemeingeltenden Regeln in der Beziehung zwischen Konstitution und Wirkung aufzustellen sind, wenn auch eine bedingte Gesetzmäßigkeit insofern zu bestehen scheint, als bei isomeren Phenylarsinsäuren durch die Stellung der Hydroxylgruppe und der Aminogruppe im Benzolring ein verschiedener therapeutischer Effekt ausgelöst wird. So leiten sich z. B. fast alle trypanoziden Präparate, die bei der Heilung der afrikanischen Schlafkrankheit und in der Bekämpfung verschiedener Tier-Trypanosen angewandt werden, von der 4-Amino-2-oxyphenylarsinsäure ab, von Verbindungen, bei denen die substituierte Aminogruppe in p- und die Hydroxylgruppe in o-Stellung zum Arsinsäurerest eingetreten ist, während die wirksamsten Antisyphilitika, Derivate der isomeren 3-Amino-4-oxyphenylarsinsäure darstellen. Der verschiedene Wirkungseffekt bei den isomeren Phenylarsinsäuren kann daher nur auf die Konstitution zurückgeführt werden.

Bekanntlich wird aus dem Verhältnis der Dosis curativa zur Dosis tolerata oder $\frac{\text{D. c.}}{\text{D. t.}}$ der therapeutische Index errechnet, der zur Beurteilung des Wertes und der Anwendungsmöglichkeit einer chemotherapeutischen Substanz dient und als Vergleichsmaß für bereits bekannte Präparate herangezogen wird. Ebenso wie bei einem Bruch durch Veränderung des Zählers oder Nenners der Wert vergrößert oder verkleinert wird, kann auch der chemotherapeutische Index durch Steigerung des chemotherapeutischen Effektes, bei gleichbleibender Verträglichkeit günstiger gestaltet werden. Andererseits kann aber auch derselbe Effekt dadurch zustande kommen, daß bei gleichbleibender Heilwirkung das Präparat eine bessere Verträglichkeit aufweist. Eine dritte Möglichkeit einer günstigeren Gestaltung des therapeutischen Index könnte dadurch gegeben sein, daß die Dosis curativa kleiner und gleichzeitig die Dosis tolerata größer wird. So konnte auch bei einer systematischen Molekülvergrößerung der therapeutische Index umgestaltet werden.

Die Einführung verschiedener Säurereste in die Aminogruppe der 3-Amino-4-oxy-phenylarsinsäure führte zur 3-Acetyl, 3-Propionyl, 3-Isobutyryl, 3-Isovaleryl und 3-n.Valerylamino-4-oxy-phenylarsinsäure, wodurch eine ständige Vergrößerung des Gesamtmoleküls erzielt wurde (Tab. I u. II).

Auf der Tabelle I sind die Phenylarsinsäuren eingezeichnet, bei denen durch Einführung höhermolekularer Säurereste der homologen Acyl-Reihe das Gesamtmolekül vergrößert wurde. Die eingeführten Säurereste sind in Tabelle II angeführt.

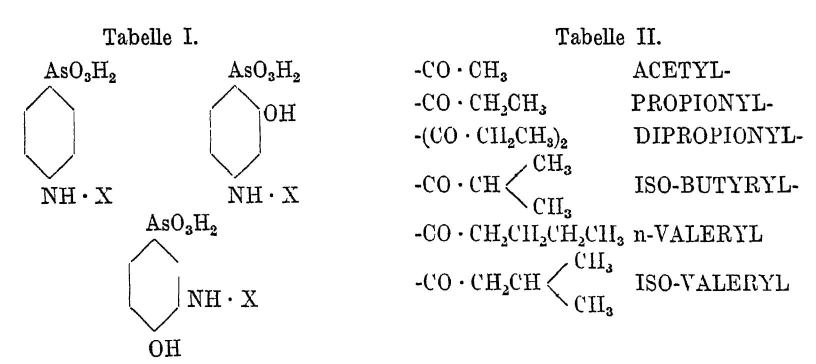


Tabelle II.

-CO · CH_3	ACETYL-
-CO · CH_2CH_3	PROPIONYL-
-(CO · $CH_2CH_3)_2$	DIPROPIONYL-
-CO · CH$<^{CH_3}_{CH_3}$	ISO-BUTYRYL-
-CO · $CH_2CH_2CH_2CH_3$	n-VALERYL
-CO · CH_2CH$<^{CH_3}_{CH_3}$	ISO-VALERYL

Bei der biologischen Auswertung dieser Präparate zeigte sich, daß die Auswirkung der Molekülvergrößerung am deutlichsten bei der peroralen Applikation in Erscheinung tritt. — So wurden von der 3-Amino-4-oxy-phenylarsinsäure 30 mg pro 20 g Maus vertragen. Die Verträglichkeit bei der 3-Acetyl-amino-4-oxy-phenylarsinsäure steigt auf 120 mg, um bei der 3-Iso-butyryl-amino-4-oxy-phenylarsinsäure den Höchststand der Verträglichkeit mit über 180 mg zu erreichen. Von der nächst höhermolekularen Verbindung, der Iso-valeryl-Verbindung, werden nur noch 80 mg vertragen. Bei der 3-n.Valeryl-4-oxy-phenyl-arsinsäure sinkt die Toleranz sogar auf 35 mg herab. Aehnliche Schwankungen wurden auch bei der intravenösen und subkutanen Applikation beobachtet, wenn auch hier die Toleranzunterschiede nicht so markant in Erscheinung traten. Unter der Dosis tolerata sind in unseren Versuchen diejenigen Mengen zu verstehen, bei denen die Mäuse noch am Leben blieben, ungeachtet der neurotoxischen Nebenwirkungen (Tab. III).

Tabelle III.

170
160
150
140
130
120
110
100
90
70
60
50
40
30
20
-H
$-COCH_3$
$-COCH<^{CH_3}_{CH_3}$
$-COCH_2CH<^{CH_3}_{CH_3}$
$-COCH_2CH_2CH_2CH_3$

In Tabelle III sind die Verträglichkeitsmengen der Präparate graphisch eingetragen. In der gestrichelten Kurvenlinie ist deren Wirksamkeit dargestellt. Die Dosierung oberhalb der horizontalen Linie löst neurotoxische Erscheinungen aus. Hingegen werden Mengen unterhalb der Linie ohne sichtbare nervöse Störungen vertragen.

Im Gegensatz zur Toleranz wird der therapeutische Effekt durch Einführung höhermolekularer Substituenten nur ganz unwesentlich beeinflußt, gleichgültig, ob die Präparate per os, intravenös oder subkutan gegeben werden.

Die großen Index-Unterschiede sind daher bei unseren Versuchen nicht auf eine Wirkungssteigerung der substituierten Arsinsäuren zurückzuführen, sondern durch eine bessere oder schlechtere Verträglichkeit der Präparate bedingt.

Bei dieser Schlußfolgerung drängt sich unwillkürlich die Frage auf, ob der Arsinsäurerest oder das Gesamtmolekül hierfür verantwortlich zu

machen ist. — Zur Beantwortung dieser Frage haben wir den Arsinsäurerest durch die Carboxylgruppe ersetzt. Aus der toxikologischen Auswertung dieser von uns hergestellten Benzoesäuren ergab sich, daß bis zur 3-Isobutyryl-amino-4-oxy-benzoesäure ebenfalls ein steiler Anstieg in der Verträglichkeitskurve zu beobachten war, dem ein ebenso steiler Abfall bei der Isovaleryl und der n.Valerylamino-benzoesäure folgte, also genau so, wie wir es bei den entsprechenden Arsenverbindungen eben gezeigt haben.

In therapeutischen Versuchen waren diese Benzoesäuren vollkommen wirkungslos. Sie vermochten weder eine Trypanosomen-Infektion noch eine Russ. Rekurrens-Infektion in irgendeiner Weise zu beeinflussen, geschweige denn zur Ausheilung zu bringen.

Die Schwankungen im therapeutischen Index bei den höher molekular substituierten 3-Amino-4-oxy-phenylarsinsäuren sind daher nur durch die verschiedene Toleranz des Gesamtmoleküls zu erklären.

Nun noch einige Worte zur Affinität der Phenylarsinsäuren zum Zentralnervensystem: bei einmaliger Gabe der Dosis tolerata der 3-Amino-4-oxy-phenylarsinsäure treten nur bei vereinzelten Mäusen leichte neurotoxische Erscheinungen auf. Mit der Dosis tolerata der 3-Acetyl-amino-4-oxy-phenylarsinsäure, dem Spirozid werden hingegen bei allen Mäusen schwere nervöse Störungen ausgelöst, die dann auch bei der 3-Isobutyrylamino-4-oxyphenylarsinsäure beobachtet wurden, während bei den höher molekularen Verbindungen, der Isovalerylamino- eine Abschwächung der neurotoxischen Erscheinungen eintrat und die n.Valeryl-Verbindung ohne alle Störungen vertragen wurde.

Das Ausbleiben der neurotoxischen Erscheinungen bei den letztgenannten Verbindungen ist wohl kaum auf eine Beseitigung der Affinität zum Zentralnervensystem zurückzuführen, sondern mit der schlechten Verträglichkeit dieser Präparate zu erklären. — Die einverleibten Mengen Arsen sind zu gering gewesen, um überhaupt noch eine Störung des nervösen Apparates bei der Maus auszulösen. Dies ist aus der obigen graphischen Darstellung (Tab. III) zu ersehen.

Aus unseren Ausführungen haben Sie ersehen, daß für eine bessere oder schlechtere Verträglichkeit der geprüften Phenylarsinsäuren und somit für das Ansteigen und Fallen des chemotherapeutischen Index weniger der Arsinsäurerest als in erster Linie das Gesamtmolekül verantwortlich zu machen ist, und daß weiter für die Auslösung der neurotoxischen Erscheinungen bei Mäusen ganz bestimmte Mengen Arsen erforderlich sind.

Wir hoffen mit unserem Vortrage einen weiteren Beitrag zur Klärung der Frage über die Beziehungen zwischen Konstitution und Wirkung gegeben zu haben. — Wir glauben, daß ein weiteres Arbeiten auf dem Gebiete der Arsenchemie nur dann von Erfolg sein kann, wenn durch systematisches Arbeiten ein tieferer Einblick in das Molekül selbst und in das Geschehen des Präparates im Organismus gewonnen werden kann.

32. Karl Burschkies (Frankfurt a. M.):

Ueber die Bedeutung der Chaulmoograsäure und deren Derivate für die Chemotherapie der Lepra und der Tuberkulose [1]).

Die früher als unheilbar angesehene Lepra wird bekanntlich durch das Chaulmoograöl beeinflußt und auch geheilt, das aus den Samen verschiedener Angehöriger der Pflanzenfamilie der Flacourtiacceen gewonnen wird, die am Amazonas, in Indien, Indochina, auf dem Malaischen Archipel und in Westafrika zu finden sind. F. B. Power und F. H. Gornall (1) haben auf Grund ihrer chemischen Untersuchungen festgestellt, daß die wirksamen Bestandteile dieser Oele in zwei charakteristischen ungesättigten Zyklofettsäuren, der Chaulmoogra- und der Hydnocarpussäure, zu suchen sind, die sonst nirgends in der Natur gefunden werden, und denen die folgende Konstitution zukommt.

$$\begin{matrix} CH = CH \\ | \\ CH_2 - CH_2 \end{matrix} \Big\rangle CH(CH_2)_{12}COOH, \qquad \begin{matrix} CH = CH \\ | \\ CH_2 - CH_2 \end{matrix} \Big\rangle CH(CH_2)_{10}COOH$$

Die Formeln wurden von Barrowcliff und Power (2) aufgestellt, von Sriner und Adams (3) bestätigt und von Perkins und Cruz (4) 1927 auf Grund der erfolgreich durchgeführten Synthese der Chaulmoograsäure sichergestellt. Danach handelt es sich um eine Δ^2c-Pentenyl-tridecansäure bzw. um eine Δ^2c-Pentenyl-undecansäure von obiger Konstitution.

Bei der früher durchgeführten peroralen Applikation der Chaulmoograöle scheiterte die zur Ausheilung der Lepra notwendige Behandlung der Erkrankten vielfach an der schlechten Verträglichkeit, während bei subkutaner Injektion die Einspritzungen wegen der gewebsreizenden Eigenschaften des Oels auf die Dauer nur schwer durchzuführen waren.

Die Auffindung der beiden aktiven ungesättigten zyklischen Fettsäuren führte dann zur Darstellung der Natrium-, Magnesium-, Barium-, Blei-, der Zinn- und Kupfer- sowie der Goldsalze der Chaulmoogra- und der Hydnocarpussäure. Trotzdem den Kupfer- und Goldverbindungen eine gewisse therapeutische Wirksamkeit bei Lepra und Tuberkulose zugesprochen wird, haben die klinischen Befunde die in sie gesetzten Erwartungen nicht erfüllt.

Dagegen hat sich der Aethylester der Gesamtfettsäuren der erstmals von Power und Gornall hergestellt, und von Engel-Bey im Jahre 1910 in die Lepratherapie eingeführt wurde, recht gut bewährt. In der Folgezeit wurden von zahlreichen Forschern wie G. A. Perkins (5), West c. s. (6), R. Adams (7), F. Hoffmann La-Roche (8), der I.G.Farbenindustrie (9), der Welcome Foundation Ltd (10) sowie von Th. Wagner-Jauregg u. H. Arnold (11) zahlreiche Ester hergestellt, auf die ich der Kürze der Zeit

1) Aus dem Forschungsinstitut für Chemotherapie Frankfurt a. M. (Direktor: Geh. Rat Prof. Dr. R. Otto).

wegen hier nicht näher eingehen kann. Neben dem von Bockmühl u. Knoll (12) dargestellten Cholesterinester hat sich vor allem der Benzylester der Fettsäuren des Chaulmoograöls bewährt, der dann auch heute zur Behandlung der Lepra vielfach verwandt wird.

Welche Zusammenhänge nun zwischen der chemischen Konstitution der Chaulmoografettsäuren und ihrer therapeutischen Wirksamkeit bei Lepra bestehen, ist bis jetzt noch wenig geklärt. Nach Reagenzglasversuchen von Schöbl ist neben den 10 bzw. 12 CH_2-Gruppen und dem fünfgliedrigen Kohlenstoffring vor allem die in ihm enthaltene Doppelbindung für die therapeutische Wirksamkeit der Chaulmoografettsäuren verantwortlich, während Adams auf Grund seiner Versuche in vitro zu dem Ergebnis kommt, daß die Doppelbindung für die therapeutische Wirkung ohne Bedeutung ist. Er prüfte u. a. die wachstumshemmenden Eigenschaften der Natriumsalze der Dihydrofettsäuren des Chaulmoograöls gegenüber sog. Mycobacterium leprae. Klinische Versuche haben schließlich ergeben, daß zwischen der Wirkung der Substanzen in vitro und in vivo keine strenge Analogie besteht.

Um die Frage zu klären, inwieweit eine Doppelbindung im Molekül der Chaulmoograöle einen Einfluß auf die therapeutische Wirksamkeit ausübt, wurden von mir zahlreiche Ester der Zyklofettsäuren mit ungesättigten Alkoholen hergestellt, zumal außer dem Allylester, der bisher therapeutisch nicht geprüft worden war, keine Ester ungesättigter Natur bekannt waren. Neben dem Chaulmoograsäurecrotyl-, Olein- und Cinnamylester wurden noch höhermolekulare ungesättigte Ester hergestellt, so u. a. der Geraniol-, Citronellol- und Linaloolester.

$$\cdot [CH_2]_{12} \cdot CO_2 \cdot CH_2 \cdot CH{:}CH \cdot CH_3$$

$$\cdot [CH_2]_{12} \cdot CO_2 \cdot CH_2 \cdot [CH_2]_7 \cdot CH{:}CH \cdot [CH_2]_7 \cdot CH_3$$

$$\cdot [CH_2]_{12} \cdot CO_2 \cdot CH_2 \cdot CH{:}CH \cdot C_6H_5$$

$$\cdot [CH_2]_{12} \cdot CO_2 \cdot CH_2 \cdot CH{:}C(CH_3) \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH{:}C(CH_3)_2$$

$$\cdot [CH_2]_{12} \cdot CO_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH(CH_3) \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH{:}C(CH_3)_2$$

$$\begin{array}{l} \qquad\qquad\qquad\quad CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH{:}C(CH_3)_2 \\ \qquad\qquad\qquad\quad | \\ \cdot [CH_2]_{12} \cdot CO_2 \cdot C \cdot CH_3 \\ \qquad\qquad\qquad\quad | \\ \qquad\qquad\qquad\quad CH{:}CH_2 \end{array}$$

Auf die chemische Herstellung dieser Verbindungen kann ich hier nicht näher eingehen, ich verweise auf die Veröffentlichungen in den Berichten der Deutschen Chemischen Gesellschaft (13).

Tierexperimentelle Untersuchungen ergaben nun, daß sich die ungesättigten Ester wohl durch eine bessere Verträglichkeit auszeichnen, eine Steigerung der therapeutischen Wirkung war jedoch gegenüber den gesättigten Estern nicht erkennbar.

Ich habe deswegen versucht, durch chemische Modellierung der beiden zyklischen Fettsäuren zu besser wirksamen Heilmitteln gegen die Lepra zu gelangen. Durch Reduktion der Chaulmoogramischsäure-äthylester nach dem bekannten Verfahren nach Beauveault-Blanc mittels Alkohol und metallischem Natrium konnten die den Säuren analogen Alkohole, nämlich der Chaulmoogryl- und der Hydnocarpylalkohol hergestellt werden.

$$-[CH_2]_{12}CH_2OH, \qquad -[CH_2]_{10}CH_2OH$$

Die in einer wäßrigen Lezithinsuspension subkutan injizierten Alkohole erwiesen sich indessen als gewebsreizend und zur chemotherapeutischen Behandlung ungeeignet. Dagegen haben sich die Carbonsäureester der beiden zyklischen Alkohole als brauchbar erwiesen.

Von den zahlreich hergestellten Estern mögen nur einige hier kurz erwähnt sein, so der Crotonsäurehydnocarpylester, der Tiglin-, Palmitin-, Stearin-, Olein- und Ricinolsäurechaulmoogrylester, der Linolsäurehydnocarpylester, sowie der Zimtsäurechaulmoogryl- bzw. Hydnocarpylester, der Bromzimtsäurechaulmoogryl-, der Methoxyzimtsäurehydnocarpyl-, sowie der p-Cumenylacrylsäurechaulmoogrylester, teils farblose Oele, die sich recht gut subkutan injizieren lassen.

$CH_3 \cdot CH{:}CH \cdot CO_2 \cdot [CH_2]_{10} \cdot$

$CH_3 \cdot CH{:}C(CH_3) \cdot CO_2 \cdot CH_2\ [CH_2]_{12} \cdot$

$CH_3 \cdot [CH_2]_{14\ \text{bzw.}\ 16}\ CO_2 \cdot CH_2 \cdot [CH_2]_{12} \cdot$

$CH_3 \cdot [CH_2]_7 \cdot CH{:}CH\ [CH_2]_7 \cdot CO_2 \cdot CH_2[CH_2]_{12} \cdot$

$CH_3 \cdot [CH_2]_5 \cdot CHOH \cdot CH_2 \cdot CH{:}CH \cdot [CH_2]_7 \cdot CO_2 \cdot CH_2 \cdot [CH_2]_{12} \cdot$

$CH_3 \cdot [CH_2]_4 \cdot CH{:}CH \cdot CH_2 \cdot CH{:}CH \cdot [CH_2]_7 \cdot CO_2 \cdot CH_2 \cdot [CH_2]_{10} \cdot$

$\cdot CH{:}CH \cdot CO_2 \cdot CH_2 \cdot [CH_2]_{10\ \text{bzw.}\ 12} \cdot$

$CH_3O \cdot \quad \cdot CH{:}CH \cdot CO_2 \cdot CH_2 \cdot [CH_2]_{10} \cdot$

$(CH_3)_2 > CH \cdot \quad \cdot CH{:}CH \cdot CO_2 \cdot CH_2 \cdot [CH_2]_{12} \cdot$

Von diesen Verbindungen hat sich vor allem der Zimtsäurechaulmoogryl- bzw. Hydnocarpylester (Präparat 823) bei der Behandlung der auf Mäuse übertragenen sog. Rattenlepra, wie R. Kudicke nachgewiesen hat, als durchaus brauchbar erwiesen, wie aus folgender Tabelle zu ersehen ist, während mit den aliphatischen Carbonsäureester keine so günstigen Resultate erzielt wurden.

Uebersicht über das Ergebnis der Behandlung Ratten-leprainfizierter Mäuse mit der Substanz 823. 8 subkutane Injektionen 0,05 je 20 g Maus in 10-tägigen Abständen. Beginn der Behandlung am 8. Tage. Getötet am 88.—94. Tage nach der Infektion.

Größe der Leprome in qcm.

Behandelt		Unbehandelt	
2,21	2,64	0,84	3,42
0,18	1,30	0,98	3,50
1,40	0,24	4,62	3,60
0,84	1,40	3,36	2,35
2,20	1,66	3,36	3,71
2,30		1,30	2,94
		1,50	1,44
Mittel = 1,49		Mittel = 2,62	
Differenz 2,62 — 1,49 = 1,13 ± 0,4			

Die mathematische Prüfung ergibt, daß die Differenz mit einer Wahrscheinlichkeit von 199:1 Proz. gesichert ist.

Uebersicht über das Ergebnis der Behandlung Ratten-leprainfizierter Mäuse mit der Substanz 823. Fortlaufende Behandlung. Subkutane Injektionen 0,05 je 20 g Maus in 10-tägigen Intervallen. Beginn der Behandlung am 13. Tag. Tastbefund am lebenden Tier.

Größe	I	II	III	IV	V (ulzeriert)	
1) am 97. Tag						
Behandelt	1	1	6	4	0	= 12
Unbehandelt	0	2	2	6	3	= 13
2) am 120. Tag						
Behandelt	1	1	0	7	2	= 11
Unbehandelt	0	0	0	4	6	= 10

I = linsengroß; II = erbsengroß; III = bohnengroß; IV = kirschgroß und größer.

Für die therapeutische Wirkung des obigen Präparates ist wohl die Zimtsäure mitverantwortlich, da der dem Zimtsäurechaulmoogrylester analoge Cinnamoylglykolsäurechaulmoogrylester

$$C_6H_5 \cdot CH{:}CHCOOCH_2COOCH_2(CH_2)_{12} \cdot C_5H_7$$

eine ähnliche Beeinflussung der leprösen Krankheitserscheinung erkennen ließ.

Auf Grund meiner Versuche kann gesagt werden, daß eine Wirkungssteigerung im Sinne einer sterilisierenden Therapie zwar bis jetzt noch nicht erreicht wurde, daß es jedoch durch geeignete Modellierung der beiden zyklischen Alkohole wie Veresterung mit geeigneten Säuren möglich ist, zu maximal wirksamen Heilmitteln gegen die Lepra zu gelangen.

Sollten die so günstigen Wirkungen, die bei der auf Mäuse übertragenen Rattenlepra erkennbar waren, auch beim Menschen in Erscheinung treten, so wären wir in der Behandlung der noch vor wenigen Jahrzehnten als vollkommen unheilbar angesehenen Lepra einen bedeutsamen Schritt weitergekommen.

Da zwischen den Lepra- und den Tuberkelbazillen eine nahe Verwandtschaft besteht und seit einer Reihe von Jahren Chaulmoograöl sowie Ester der Fettsäuren bei der Tuberkulosetherapie mit wechselndem Erfolg verwendet werden, lag nahe, auch Ester der Chaulmoograsäure mit ungesättigten Alkoholen sowie Carbonsäureester des Chaulmoogrylalkohols einer experimentellen Prüfung zu unterziehen. Insbesondere interessierte der bei der Rattenlepra so wirksame Zimtsäurechaulmoogrylester (Präparat 823), um so mehr als nach den Angaben von Schöbl die Zimtsäure eine der auf Tuberkelbazillen am stärksten entwicklungshemmend wirkenden organischen Verbindungen darstellt, und Landerer über so günstige Wirkungen der Zimtsäure und deren Derivate bei experimenteller Tuberkulose des Kaninchens berichtet.

Die von R. Prigge am Staatl. Institut für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M. durchgeführte Prüfung meiner Präparate hat leider eine wirksame Beeinflussung der experimentellen Meerschweinchentuberkulose nicht erkennen lassen, wie überhaupt die Behandlung tuberkulöser Erkrankungen mit Chaulmoograderivaten bis heute keine ganz eindeutigen, im allgemeinen noch wenig befriedigende Resultate ergeben hat.

Schrifttum.

1) Power, F. B., u. Cornall, F. H., J. chem. Soc. London **85**, 846, 838 (1904). — 2) Barrowcliff, M., u. Power, F. B., J. chem. Soc. London **91**, 557 (1907). — 3) Shriner,

R. L., u. Adams, R., J. amer. chem. Soc. **47**, 2727 (1925). — 4) Perkins, G. A., u. Gruz, A. O., J. amer. chem. Soc. **49**, 517, 1070 (1927). — 5) Perkins, G. A., Philippine J. Sci. **24**, 621 (1924). — 6) Herrera-Batteke, P., u. West, A. P., Philippine J. Sci. **31**, 161 (1926). — 7) Adams, R., J. Pharm. **45**, 121 (1932). — 8) Hoffmann, F. La-Roche, Schweiz. Pat. 139326 (1930). — 9) I.G.Farbenindustrie, Engl. Pat. 311236 (1929) C. 1930 II 2672 u. Dtsch. Reichs-Pat. 529811 (1931) C. 1931 II 171. — 10) Welcome Foundation Ltd, Engl. Pat. 369062 (1932) C. 1932 II 1199. — 11) Wagner-Jauregg, Th., c. s. Ber. **70**, 1459 (1937); J. pr. Chem. **150**, 250 (1938); Arnold, H., Ber. **71**, 1505 (1938). — 12) I.G.Farben-Industrie (M. Bockmühl u. R. Knoll) Dtsch. Reichs-Pat. 596594. — 13) Burschkies, K., Ber. **71**, 233, 1855 (1938).

Aussprache.

R. Prigge (Frankfurt a. M.):

Im Anschluß an die Mitteilungen von Herrn Burschkies möchte ich einige allgemeinere Bemerkungen über die experimentelle Chemotherapie der Tuberkulose machen. In Deutschland wird bekanntlich die Goldtherapie der Tuberkulose sehr günstig beurteilt, während sie in der Schweiz sehr schroff abgelehnt wird. In den übrigen Ländern kann man eine mehr vermittelnde Stellungnahme konstatieren. Besonders wertvoll scheint in diesem Zusammenhang die Kritik von Martini-Bonn, einem der wenigen deutschen Kliniker, die die Goldtherapie gänzlich verurteilen. Martini hat die Goldliteratur außerordentlich sorgfältig durchgearbeitet und kommt zu dem Ergebnis, daß die ganz überwiegende Mehrzahl der Publikationen nicht geeignet ist, eine objektive Stellungnahme zu ermöglichen, und daß die wenigen, methodologisch befriedigenden Arbeiten, die es gibt, eindeutig die Wertlosigkeit der Goldtherapie dartun. Ich zitiere wörtlich: „Der Unkenntnis und Vernachlässigung der selbstverständlichen Gesetze einer therapeutischen Untersuchung ist es zuzuschreiben, daß hier eine Unsumme von Arbeit nutzlos vertan und überdies sicher vielen Kranken geschadet worden ist.“ (I. Internat. Kongreß d. Therap. Union, 19—23, V. 1937, Bern; Kongreßbericht, H. Huber-Verlag, Bern, S. 366.)

Mit dem Ergebnis von Herrn Martini stehen meine experimentellen Untersuchungen in allerbestem Einklang. Ich konnte im Tierversuch nachweisen, daß die bisher hergestellten Goldpräparate der experimentellen Tuberkulose des Meerschweinchens gegenüber nicht die geringste Heilwirkung erkennen lassen (s. S. 344—357 des oben erwähnten Kongreßberichtes). Gegen das Resultat meiner Untersuchungen kann man einwenden (und ich habe das zunächst selbst getan), die Meerschweinchentuberkulose sei von der Tuberkulose des Menschen derart verschieden, daß das Meerschweinchen nicht als geeignet zur Durchführung chemotherapeutischer Modellversuche gelten könne. Dieser Einwand hat sich jedoch als falsch erwiesen. Ich konnte nämlich feststellen, daß gewisse Verbindungen der Chaulmoograsäure, vor allem chaulmoograsaures Benzyl, ohne jeden Zweifel einen günstigen Einfluß auf die Meerschweinchentuberkulose auszuüben vermögen. Aus dem Fehlen der Wirksamkeit eines Präparates darf man also nicht auf die mangelnde Eignung des Versuchstieres, sondern nur auf die mangelnde Eignung des Präparates schließen.

Freilich stellen derartige Untersuchungen erhöhte Aufgaben an die chemotherapeutische Methodik. Unter anderem ist hier eine besonders kritische Auswertung der experimentell gewonnenen Daten unerläßlich; und nur solche Resultate können als zuverlässig gelten, die auch einer strengen variationsstatistischen Analyse standzuhalten vermögen. Infolge der sehr hohen Variabilität, die Meerschweinchen im Verhalten gegenüber der experimentellen Infektion mit Tuberkelbazillen erkennen lassen, läßt sich ein einwandfreies, variationsstatistisch gesichertes Resultat nur dann erzielen, wenn mit einer ausreichenden, im Vergleich zu anderen Gebieten verhältnismäßig hohen Anzahl von Versuchstieren gearbeitet wird. Untersuchungen, die mit einigen wenigen Meerschweinchen durchgeführt werden, können kein einwandfreies Ergebnis liefern (s. S. 344 ff. des erwähnten Kongreßberichts) und sollten daher unterbleiben.

Wir müssen uns stets vor Augen halten, daß wir es bei allen Untersuchungen nur mit Stichproben, also mit mehr oder minder großen Kollektiven von willkürlich aus größeren Beständen ausgewählten Tieren zu tun haben. Soweit bei chemotherapeutischen Untersuchungen Prozentzahlen (Prozentsatz an geheilten, überlebenden usw. Tieren) auftreten, gilt folgendes: Wird ein Versuch wiederholt, so beobachtet man nur äußerst selten wieder den gleichen Prozentsatz, sondern — je nach der Anzahl der jeweils geprüften Tiere — einen mehr oder minder abweichenden Wert. Der „wahre Wert“, also der Prozentsatz, der sich

ergäbe, wenn man den gesamten Tierbestand untersuchen könnte, bleibt dagegen unbekannt. Hier wird eine empfindliche Lücke durch die Arbeiten des Berliner Mathematikers H. v. Schelling geschlossen, der eingehende Untersuchungen über den Bereich angestellt hat, innerhalb dessen der einem beobachteten Prozentsatz zugrundeliegende „wahre Wert" zu suchen ist, und der seine Ergebnisse in Form von einfachen Tafeln veröffentlicht hat, die ohne alle mathematischen Vorkenntnisse benützt werden können und jedem Biologen eine kritische Bearbeitung seiner Versuchsresultate ermöglichen (Arb. a. d. Staatl. Inst. f. exper. Ther., Bd. 37, S. 28—54, 1939). Ich möchte nicht verfehlen, auf dieses wertvolle Hilfsmittel der biologischen Forschung nachdrücklich hinzuweisen.

Th. Wagner-Jauregg (Frankfurt a. M.):

Mit R. Kudicke vor 2½ Jahren begonnene Untersuchungen über die Chemotherapie der Lepra mit Chaulmoograderivaten haben ergeben, daß der freie Chaulmoogrylalkohol schlecht verträglich und daher für therapeutische Zwecke ungeeignet ist. Ein gemeinsam mit H. Arnold hergestellter schwefelhaltiger Abkömmling des Chaulmoogrylalkohols erzeugt eine sehr deutlich erkennbare Verzögerung in der Entwicklung der Leprome bei Mäusen und Ratten. Die Wirkung dieses Präparates ist noch ausgeprägter und anhaltender als die der Zimtsäureverbindungen des Chaulmoogrylalkohols, aber es reizt das Gewebe stärker als letztere. Bezüglich des therapeutischen Effektes im Tierversuch sind die erwähnten Derivate des Chaulmoogrylalkohols den gebräuchlichen Präparaten, welche den Rest der Chaulmoograsäure enthalten, ausgesprochen überlegen.

33. G. Ivánovics (Szeged):

Chemische Untersuchungen über die Polysaccharide des Milzbrandbazillus [1]).

Nach den bisherigen Literaturangaben sind unsere Kenntnisse über den chemischen Charakter des Milzbrandbazillen-Polysaccharids noch sehr lückenhaft. Wir können uns aber überhaupt nicht ohne Bedenken auf die älteren Befunde stützen, und zwar deshalb nicht, weil die Forscher bei der Bereitung der Extrakte von ungewaschenen Agarkulturen ausgingen. Nun wissen wir aber heute gut, daß bei der Sterilisierung des Agarnährbodens aus dem Agar wasserlösliche sogenannte „Kantene" frei werden. Diese Substanzen haben auch einen polysaccharidartigen Charakter und verhalten sich bei den verschiedenen Konzentrierungs- und Reinigungsverfahren dem Bazillen-Polysaccharid äußerst ähnlich. Es ist also mit Recht anzunehmen, daß in den durch die Forscher aus ungewaschenen Kulturen gewonnenen Extrakten „Kantene" in erheblichen Mengen anwesend sein können.

Ich habe zur Abtrennung des Milzbrandbazillen-Polysaccharids einen avirulenten Stamm verarbeitet, der zwar überhaupt keine Kapselbildungsfähigkeit besaß, dessen immunisierende Wirkung jedoch vollwertig war. Aus 24stünd. Agarkulturen dieses Stammes wurde folgenderweise ein Extrakt bereitet: vorerst wurden die Kulturen mit Salzwasser abgespült, dann dreimal wiederholt mit großen Mengen Salzwasser gewaschen und zentrifugiert und schließlich zur Entfernung der etwa in die Suspension gelangten gröberen Agarteilchen durch Gaze filtriert. Da beim Heißextraktionsverfahren immerhin damit zu rechnen ist, daß etwa in die Suspension geratene Agarteilchen mitgelöst werden, wurde anstatt dessen die Aufschließung der Zellen durch

1) Aus dem Hygienischen Institut der Universität Szeged.

Autolyse bewirkt. Diese Autolyse wurde in kleine Mengen Trypaflavine enthaltendem Phosphatpuffer von pH 8,0 vorgenommen. In diesem Medium zerfallen die Bazillen binnen 24 Std. vollständig. Nun wurde das Autolysat mit Essigsäure schwach angesäuert und nach dem Filtrieren im Vakuum bei 70° bis auf ein kleines Volum eingeengt. Dabei kamen Eiweißstoffe zur Ausscheidung, die abfiltriert wurden. Das Filtrat wurde jetzt wiederholt durch Alkohol präzipitiert und der wasserunlösliche Anteil des Niederschlages entfernt. Die Hauptmenge der spezifischen Substanz fiel bei einer Alkoholkonzentration 1,5—2,5 Volum in Form einer gummiartigen, klebrigen Masse aus. Die letzten Spuren der Eiweiße wurden nach dem Verfahren von Savage mittels einer Denaturierung durch Butylalkohol-Chloroform entfernt. Der wäßrige Auszug wurde noch einige Tage lang dialysiert und dann mit heißer Barytlauge behandelt, wodurch Verunreinigungen mit nichtspezifischen Substanzen entfernt werden konnten. Nach der Entfernung des überschüssigen Bariumhydroxyds durch Kohlensäure wurde wiederum dialysiert und schließlich die spezifische Substanz mit Alkohol gefällt, die dann im Vakuum bei 70° über Phosphorpentoxyd getrocknet wurde.

Auf dem früher geschilderten Weg wurden insgesamt 800 Kolle-Flaschenkulturen verarbeitet; dies entspricht 160 g gewaschenen, trockenen Bazillen. Aus dieser Menge wurden 4 g, also 2,6 Proz. spezifische Substanz gewonnen. Die abgetrennte spezifische Substanz stellte ein wasserlösliches, weißes Pulver dar; sie enthält 0,6 Proz. Asche, 4,1 Proz. Stickstoff (der bei Hydrolyse in seiner ganzen Menge zu Aminostickstoff wird) und liefert bei der mit normaler Schwefelsäure bewirkten Hydrolyse 60 Proz. reduzierende Substanz. Die Substanz war mit Milzbrandimmunsera bis zur Verdünnung 1:1000000 bis 1:2000000 präzipitierbar. Mit antikapsularem Antikörper reagierte die Substanz überhaupt nicht.

Ich habe das Präparat auch auf eine etwaige Agarverunreinigung untersucht. Zu diesem Zwecke schien die Piriesche Diphanylaminprobe ganz besonders geeignet zu sein, denn man kann mit ihr noch 0,03—0,05 mg Agar bestimmt nachweisen. 10 mg Präparat zeigte nur eine derart schwache Piriesche Reaktion, die schon an der Empfindlichkeitsgrenze der Probe lag, so daß die Verunreinigung an Agar unbedingt weniger als ½ Prozent ausmacht. Demgegenüber zeigte ein Extrakt, das aus ungewaschenen Kulturen durch heiße Lauge gewonnen und nachher mit Hilfe des Alkoholpräzipitationsverfahrens gereinigt wurde, eine derart starke Piriesche Reaktion, daß die Agarverunreinigung wenigstens auf 50 Proz. der Trockensubstanz geschätzt werden durfte.

Die spezifische Substanz und das Hydrolysat gab keine Eiweißreaktionen. Von den Kohlenhydratreaktionen fiel nur die Molischsche Probe positiv aus, während die Orzin-, Phlorogluzin-, Naphtoresorzin- und Seliwanoffsche Probe negativ verlief. Es ist demnach unzweifelhaft, daß man in der spezifischen Substanz als Baustein weder Pentose noch Glukuronsäure auffinden kann.

Die von mir isolierte Substanz scheint schon ziemlich weitgehend einheitlich zu sein. Dafür spricht vor allem die fast zu vernachlässigende Differenz, die zwischen den bei verschiedenen Azetonkonzentrationen ausgefällten Fraktionen besteht (s. Tabelle I).

Um den chemischen Charakter der spezifischen Substanz zu erforschen, habe ich vorerst eine hydrolytische Spaltung durchgeführt. Zu diesem Zwecke wurden 1,4 g Substanz mit 30 ccm 4proz. Salzsäure 4 Std. lang im Rückflußkühler gekocht und die so erhaltene Lösung bis zur Sirupkonsistenz eingeengt.

Tabelle I.

Fraktionierte Fällung der spezifischen Substanz aus wäßriger Lösung (auf 1,1 g spez. Subst. 10 ccm Wasser) durch anwachsende Mengen Azeton.

Fraktion	Azeton %	Menge d. Frakt. gr.	(α)	N %	Reduktionsvermögen nach der Hydrolyse %	Präzipitationstiter	N-Gehalt (mg) des aus 2 ccm Immunserum gewonnenen Präzipitats — Menge der zugesetzten spez. Subst. 0,3 mg[1])	0,1 mg[2])
Unfraktioniert	—	—	+65,7°	4,08	60,0	1:800 Tausend	0,390	0,380
A	46	0,71	+64,3°	4,20	59,5	„	0,372	0,390
B	46—50	0,25	+67,3°	4,48	58,0	„	0,370	0,398
C	50—63	0,09	—60,0°	4,10	57,0	„	0,390	0,386
D	63—73	Nur Spuren	Nicht untersuchbar					

1) Spezifische Substanz in geringem Ueberschuß.
2) Ungefähr beim Aequivalentpunkt des Antigen-Antikorpers.

Nach einigem Stehen in der Kälte schieden sich aus der Lösung farblose Kristalle aus, die aus einem Gemisch von Aether-Alkohol umgelöst werden konnten. Es wurden so 0,1 g einer schönen kristallinen Substanz gewonnen, die sich mit d-Glukosamin-chlorhydrat identisch erwies; dies ist aus folgenden Analysebefunden ohne weiteres ersichtlich:

	Isolierte Substanz	d-Glukosamin-HCl (berechnete bzw. im Schrifttum verzeichnete Werte)
Reduktionsvermögen von 0,2 mg Substanz	0,165 mg	0,164 mg
N	6,33 Proz.	6,51 Proz.
Cl	15,64 Proz.	16,42 Proz.
Spezifisches Drehungsvermogen	+ 68,8	+ 68,0

Zusammenfassend läßt sich nun folgendes sagen: Man kann unter geeigneten Versuchsbedingungen das spezifische Polysaccharid des Milzbrandbazillenkörpers auch bei Verarbeitung von Agarkulturen agarfrei abtrennen. Die auf geeignete Weise isolierte und gereinigte spezifische Substanz enthält — im Widerspruch zum Verhalten der durch Combiescu und Mitarbeiter gewonnenen Extrakte — weder Pentosen noch Glukuronsäure. Der Salzsäure-hydrolytische Abbau des Polysaccharids führte zu d-Glukosaminchlorhydrat. Es ist nicht ausgeschlossen, daß Glukosamin nicht der einzige Baustein des Polysaccharid-Moleküls ist, sondern außer diesem vielleicht auch noch andere Substanzen im Aufbau beteiligt sind.

34. Kurt Laubenheimer:

Erfahrungen mit der Blutgruppenprobe [1]).

Bei den schwerwiegenden Folgen, die der Ausfall der Blutgruppenprobe für den einzelnen und für die Familie haben kann und im Hinblick auf das Interesse, das der nationalsozialistische Staat an der Klarstellung der Abstammung eines jeden Volksgenossen hat, ist man nur dann berechtigt, eine naturwissenschaftlich-medizinische Methode wie die Blutgruppenbestimmung in der Praxis anzuwenden und sie zu einer Grundlage der Rechtsfindung zu machen, wenn ihre Ergebnisse so gesichert erscheinen, daß sie als untrügliches Beweismittel gelten können.

Bald nach der häufigen Anwendung der Methode setzte die Kritik ein und behauptete, daß von den angenommenen Vererbungsregeln der Blutgruppen „Ausnahmen" vorkämen. Wenn tatsächlich solche Ausnahmen bestehen sollten, so wäre damit der Stab über die Blutgruppenprobe gebrochen. Je größer aber das Untersuchungsmaterial wurde, je mehr man die Fehlerquellen der Methode kennen und vermeiden lernte, desto mehr schrumpfte die Zahl der sogenannten „Ausnahmen" zusammen.

Auf Grund einer überwältigenden Zahl von Einzeluntersuchungen, vor allem von Mutter-Kind-Untersuchungen, bei denen der Fehler einer etwaigen Illegitimität ausgeschaltet ist, darf man heute die Blutgruppenprobe als ein absolut zuverlässiges Beweismittel bewerten. Ergebnisse, die den Vererbungsregeln zu widersprechen scheinen, beruhen auf unzureichender Technik, mangelhafter serologischer Ausbildung des Untersuchers oder auf Unachtsamkeit. Eine weitere Ursache für Fehlbestimmungen war dadurch gegeben, daß von der Industrie Testsera in den Handel gebracht wurden, die häufig den an sie zu stellenden Anforderungen in bezug auf Wirksamkeit und Spezifität in keiner Weise genügten. Selbst Verwechslungen der Testsera untereinander an der Fabrikationsstätte und Abgabe derselben an den Verbraucher unter falscher Bezeichnung sind wiederholt festgestellt worden.

Aus den angeführten Gründen sind zahlreiche Fehlgutachten zustandegekommen, die geeignet waren, die Blutgruppenprobe in Richter- und Laienkreisen in Mißkredit zu bringen. Ein Fehlurteil in den hier zu klärenden Fragen muß sich besonders verhängnisvoll auswirken, da stets Menschenschicksale davon betroffen werden.

Um Fehler bei der Blutgruppenbestimmung zu vermeiden, hat es sich daher als nötig erwiesen, Richtlinien mit Gesetzeskraft aufzustellen, durch die die Auswahl der Sachverständigen und die bei den Blutgruppenbestimmungen anzuwendende Technik geregelt sowie eine staatliche Prüfung der in den Handel gebrachten Testsera eingeführt wurden.

---

1) Aus dem Staatl. Institut für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M. (Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. R. Otto).

Die Richtlinien, die auf Grund langjähriger Erfahrungen zusammengestellt sind, verpflichten den Sachverständigen, eine bestimmte bewährte Technik einzuhalten, die nach Möglichkeit alle Fehlerquellen berücksichtigt und eine größtmögliche Sicherheit der Untersuchung gewährleistet. Von großer Bedeutung ist die Vorschrift, daß nur staatlich geprüfte Testsera zur Blutgruppenbestimmung in gerichtlichen Fällen und bei Bluttransfusionen in Anwendung kommen dürfen. Die staatliche Prüfung, die im Staatlichen Institut für experimentelle Therapie durchgeführt wird, hat sich als sehr nützlich erwiesen. Es wurden hierdurch schon eine große Zahl Testsera zurückgewiesen, die nicht den geforderten Mindesttiter von 1 : 64 aufwiesen, oder durch Bakterien verunreinigt waren. In einem Falle wurde auch eine Verwechslung aufgedeckt, die in der Fabrikationsstätte stattgefunden hatte. Die staatliche Prüfung bezieht sich bei Isosera auf Titerhöhe und Sterilität. Bei Immunsera Anti-M und Anti-N wird das Rohserum daraufhin geprüft, ob es nach der von den Herstellungsstätten gemachten Angaben zu absorbieren ist in der Weise, daß spezifische „Abgüsse“ mit einer Titerspanne von mindestens 5 Stufen zwischen M und N hergestellt werden können. Fertig hergestellte Abgüsse werden nicht staatlich geprüft, weil für ihre Haltbarkeit keine Gewähr gegeben werden kann. Der Sachverständige muß sich vielmehr verpflichten, Abgüsse von den aus dem Handel bezogenen staatlich geprüften Rohsera selbst herzustellen. Diese Bestimmung wurde aufgenommen, um den Sachverständigen zu zwingen, sich die für eine Blutgruppenbestimmung erforderlichen serologischen Kenntnisse anzueignen. Denn die besten Testsera nützen nichts, wenn sie nicht von einem erfahrenen und in der Blutgruppenbestimmung noch besonders ausgebildeten Untersucher angewandt werden.

Eine einwandfreie Blutgruppenbestimmung ist keineswegs immer leicht. Es kommen nicht selten Fälle vor, welche zu Irrtümern Veranlassung geben können, wenn der Sachverständige nicht über große Erfahrungen verfügt. Hier ist vor allem die schwache Ausbildung eines Rezeptors zu nennen, wie sie für die Blutgruppe A erwiesen ist. Das Uebersehen eines schwach ausgebildeten A, also des A_2, kann besonders dann zu Fehlbestimmungen führen, wenn die Kombination A_2B bei Kleinkindern vorliegt, bei denen die Agglutinine noch nicht ausgebildet sind, und die Kontrolle durch den sog. Kreuzversuch versagt. Um ein A_2 in den erwähnten Fällen nicht zu übersehen, müssen hochwertige Testsera angewandt werden, am besten mit einem Titer von 1 : 128. Bei der staatlichen Prüfung wird daher auch darauf geachtet, daß die Anti-A-Sera auch das A_2 in einem Blute A_2B sicher anzeigen. Gerade in solchen Fällen hat sich auch die Verwendung eines 0-Serums besonders bewährt. Es zeigt sich nämlich häufig, daß die Anti-A-Komponente des 0-Serums, auch wenn sie nur einen Titer von vielleicht 1 : 32 hat, ein schwaches A besser anzeigt als ein B-Serum (Anti-A) mit höherem Titer. Die Verwendung eines 0-Testserums ist daher in keinem Falle zu unterlassen.

Andererseits konnte ich wiederholt beobachten, daß zwar die Rezeptoren A und B von den Testsera gut angezeigt wurden, daß aber die entsprechenden Agglutinine in dem zugehörigen Serum nur schwach oder anscheinend auch gar nicht ausgebildet waren. In solchen Fällen sprach man wohl von „defekten Gruppen“. Verdünnt man aber solche Sera, die eine derartige Hemmung zeigen auf ½ oder gar auf ¼, so entfalten sie eine starke agglutinierende Wirkung. Diese Hemmungszone, auch Prozone genannt, ist eine Erscheinung, die zuweilen auch bei agglutinierenden Sera gegen Bakterien in unverdünntem Zustande auftritt und offenbar mit einem gewissen Dispersitätsgrad der Eiweißmoleküle in Zusammenhang steht.

Ob A_1 und A_2 nun quantitativ verschieden sind oder unterschiedliche Gene darstellen und dementsprechend für die Beurteilung von Abstammungsfragen bewertet werden können, ist noch nicht mit Sicherheit entschieden. Hierüber muß durch weitere Familienuntersuchungen noch größeres Material gesammelt werden. In Vaterschaftsprozessen lassen sich A_1 und A_2 bedingt verwerten, d. h. ihre Bestimmung läßt Schlüsse mit einiger Wahrscheinlichkeit zu, sie erlaubt jedoch nicht die Vaterschaft eines Mannes als „offenbar unmöglich" zu bezeichnen.

Auch die Frage, ob es einen schwachen N-Rezeptor, ein N_2, gibt oder ob N ganz fehlen kann, wo es nach den Vererbungsgesetzen vorhanden sein müßte, kommt hin und wieder immer noch zur Erörterung. Die von Crome und Friedenreich beschriebenen Fälle von angeblichem Fehlen von N haben sich längst als Irrtum erwiesen, hervorgerufen durch Verwendung von nicht genügend hochwertigem Anti-N-Sera. Sie werden aber trotzdem immer noch als Beweis für das angebliche Vorkommen von „Ausnahmen" von manchen Seiten angeführt. Es wäre an der Zeit, daß diese „Ausnahmen" aus der Literatur endgültig verschwänden. In dem heute schon vorliegenden sehr großen Material von Mutter-Kind-Kombinationen findet sich auch nicht ein einziger Fall, der den Vererbungsgesetzen widerspricht. So konnte auch ich bei rund 2000 Mutter-Kind-Untersuchungen in keinem Falle eine Kombination der Blutkörperchenmerkmale beobachten, die den Vererbungsgesetzen widersprochen hätte. Der Nachweis des Blutkörperchenmerkmals N stieß niemals auf Schwierigkeiten. Ein schwaches N oder N_2 wurde bei frischen Blutproben nicht beobachtet. Man darf das Ergebnis der M- und N-Bestimmung als ebenso beweiskräftig ansehen wie das der sogenannten „klassischen" Blutgruppen 0, A, B und AB. Auch das Reichsgericht hat in letzter Zeit den Beweiswert der Blutkörperchenmerkmale M und N ohne Einschränkung anerkannt. In dem Urteil des 4. Strafsenates vom 12. 4. 1938 — 4 D 180/38 heißt es:

„Nach dem heute erreichten Stande der Wissenschaft muß die Lehre von der Vererbung der Blutfaktoren M und N und die Möglichkeit, die Erzeugung eines Kindes von einem bestimmten Manne auszuschließen, als eine gesicherte naturwissenschaftliche Erkenntnis gelten."

Allerdings scheinen die Rezeptoren M und N gegen äußere Einflüsse, besonders auch gegen das Altern, weniger stabil zu sein, als A und B. Schon nach 24 Std. kann die Agglutinabilität der M- und N-Substanz merklich herabgesetzt sein. Bei der Titerfestsetzung durch die staatliche Prüfung werden daher außer frisch entnommenen auch 24 Std. alte Blutkörperchen als Testobjekte mit herangezogen, die von den zu prüfenden Sera in der angegebenen Titerhöhe deutlich agglutiniert werden müssen, wenn das Serum zugelassen werden soll. Dieser strenge Maßstab ist deshalb erforderlich, weil in der Praxis die Blutkörperchen bei Ansetzung der Probe häufig 24 Std. und noch älter sind, besonders dann, wenn die Blutproben von auswärts zur Untersuchung eingeschickt werden.

Eine derartige, durch äußere Umstände verursachte Abschwächung der Agglutinierbarkeit der Blutkörperchen darf nicht gleich gesetzt werden mit genetisch bedingten schwach ausgebildeten Rezeptoren und berechtigt nicht, von einem schwachen Typus oder von Typus 2, 3 usw. zu sprechen.

Andererseits kann es aber auch vorkommen, daß durch äußere Einflüsse die Blutkörperchen derart verändert werden, daß eine unspezifische Agglutination auftritt. So konnte ich wiederholt beobachten, daß von auswärts eingesandte Blutproben, bei denen durch Kälte im Winter oder durch Hitze

im Sommer eine wenn auch nur geringe Hämolyse eingetreten war, eine unspezifische M- oder N-Agglutination auftrat.

Macht die einwandfreie Bestimmung von M und N durch die Agglutination im Objektträger- und Röhrchenversuch Schwierigkeiten, so kann mit Erfolg der Absättigungsversuch zur Kontrolle mit herangezogen werden. Man wird allerdings den Wert dieser Methode nicht überschätzen dürfen in dem Sinne, daß mit ihr das Vorliegen eines „schwachen N" oder N_2 festgestellt werden könnte, das durch die Agglutinationsreaktion nicht nachgewiesen werden kann. Denn, ist ein Agglutinogen so schwach ausgebildet, daß es durch ein hochwertiges homologes Serum nicht agglutiniert wird, so besagt das nichts anderes, als daß die Bindung des Agglutinins so schwach ist, daß die Reaktion nicht sichtbar wird. In diesem Fall ist auch im Absättigungsversuch die spezifische Bindung so geringfügig, daß sie dem Nachweis entgeht. Wenn also der Absättigungsversuch auch nicht mehr leisten kann als die Agglutination, so ist er doch zur Kontrolle wertvoll.

Gegen den Wert der Blutgruppenbestimmungen als Beweismittel in Abstammungsfragen ist nun neuerdings wieder Sturm gelaufen worden, und zwar von einem Universitätsinstitut für Rasseforschung, von einer Seite also, von der man es eigentlich am wenigsten hätte erwarten sollen. Man könnte über diese Einwendungen mit Stillschweigen hinweggehen, zumal sie, soviel ich sehe, von keinem anderen Institut für Erb- oder Rasseforschung geteilt werden. Eine Zurückweisung erscheint aber deshalb geboten, weil das betreffende Institut an die Gerichte ein „Formular" versandt hat, das geeignet erscheint, erneut eine Unsicherheit bei den Gerichten hervorzurufen. In diesem Formular heißt es u. a.

„Es ist nicht möglich, mit bestimmten Blutgruppenbefunden eine Vaterschaft „mit Sicherheit" auszuschließen, weil der Rückschluß von einem Erscheinungsbild auf ein Erbbild niemals völlig sicher ist und weil auch über den Erbgang der sog. Blutgruppen verschiedene Meinungen möglich sind. Dies wird von dem Serologen in der Regel nicht beachtet. Der Serologe ist zwar für die Vornahme der (technisch sehr empfindlichen) Blutgruppenbestimmung, jedoch nicht fur die erbbiologische Deutung des Blutgruppenbefundes zuständig. Für den Rassebiologen, in dessen Arbeitsbereich die erbbiologische Deutung des Blutgruppenbefundes gehört, ist die Blutgruppe nicht mehr als irgendein anderes erbliches Merkmal und immer weniger als mehrere verschiedene erbliche Merkmale."

Entgegen den vorstehend auszugsweise wiedergegebenen Ansichten ist der Erbgang der von Serologen entdeckten individuellen Differenzierung der Körper- und Blutzellen (Blutgruppen) beim Menschen durch die Arbeit von Serologen auf Grund eines heute schon riesigen Tatsachenmaterials so sicher fundiert, daß man von höchster Sicherheit oder offenbarer Unmöglichkeit in Ausschlußfällen sprechen kann. Ausnahmen, die im Anfang der Blutgruppenforschung vielfach beschrieben worden sind, konnten auf technische Fehler oder auf Mangel der einfachsten serologischen Kenntnisse der sog. „Sachverständigen" zurückgeführt werden. Daß auch bei Familienforschungen immer einmal mit illegitimen Kindern zu rechnen ist, wurde ebenfalls vielfach nicht beachtet.

Das menschliche Wissen und die wissenschaftlichen Erkenntnisse gründen sich auf Erfahrungen und auf Beobachtungen. Wenn die Wissenschaft durch viele, viele Einzeluntersuchungen immer wieder die gleiche Tatsache feststellt und dabei auf keine Ausnahmen stößt, welche einer ernsthaften Kritik standhalten, so ist die Wissenschaft berechtigt, die gewonnenen Erkenntnisse in Lehrsätze zusammenzufassen. Wenn auch kein mit naturwissenschaftlich-medizinischen Mitteln zu führender Beweis ein mathematisch exakter sein kann und „ein unbedingt sicheres Wissen der menschlichen Erkenntnis im allgemeinen verschlossen ist" (Reichsgericht, Urteil

vom 14. 11. 32), so ist das Bestätigungsmaterial gerade bei den Blutgruppen so erdrückend groß, daß man hier von *Sicherheit* sprechen kann.

Weiter ist zu betonen, daß die Blutgruppen in ihrem Werte als Beweismittel in Abstammungsfragen nicht mit anderen erblichen Eigenschaften, die mit den Methoden der Erbbiologie oder Rassenforschung festgestellt werden können, gleichzusetzen sind, sondern eine besondere Stellung einnehmen. Die Blutgruppen werden mit von den erbbiologischen grundsätzlich ganz verschiedenen Untersuchungsmethoden, die biologischer Natur und streng spezifisch sind, nachgewiesen. Das Ergebnis, das mit solchen Methoden, die letzten Endes chemisch-physikalischer Art sind, gewonnen wird, ist ebenso spezifisch und beweisend wie andere mit serologischen Methoden erhobene Befunde, z. B. die spezifische Eiweißdifferenzierung, auf die sich die Unterscheidung von Menschen- und Tierblut aufbaut. Diese serologische Methode ist seit Jahrzehnten in die Gerichtspraxis eingeführt, und kein Gericht nimmt heute Anstand, auf ihre Ergebnisse ein Urteil über Leben oder Tod eines Menschen zu gründen. In gleicher Weise sind die durch spezifische serologische Untersuchungsmethoden gewonnenen Ergebnisse und Erkenntnisse in der Blutgruppenfrage zu bewerten.

Durch die *Blutgruppenbestimmung allein* kann unter Umständen der Ausschluß eines Mannes als Erzeuger eines Kindes mit absoluter Sicherheit ermöglicht werden. Mit *erbbiologischen Untersuchungsmethoden allein* ist man, wenigstens heute, noch nicht in der Lage, zu einem derartigen eindeutigen Ergebnis zu gelangen, sondern die Vaterschaft oder Nichtvaterschaft kann nur mehr oder weniger *wahrscheinlich* gemacht werden, wobei ich von Entscheidungsmöglichkeiten, die sich durch das Vorkommen von pathologischen Erbvarianten ergeben können, absehe.

Gegen den absoluten Beweiswert der Blutgruppenbestimmungen wird auch zuweilen der Einwand erhoben, daß bei der Annahme, die Bluteigenschaften A und B seien aus einer Urrasse 0 durch Mutation entstanden, auch heute noch mit einer derartigen sprunghaften Aenderung der Blutgruppengene gerechnet werden müsse. *Theoretisch* ist das Auftreten einer Mutation auch in der Gegenwart denkbar. Andererseits deutet doch alles darauf hin, daß, wenn überhaupt einmal eine derartige Mutation stattgefunden hat, sie in prähistorischen Zeiten eingetreten ist, und daß die Blutgruppen heute zu den sog. gefestigten Genen gehören, die einer weiteren Mutation, in kürzeren Lebenszeiträumen des Menschengeschlechtes wenigstens, nicht mehr unterworfen sind. Auf das Entstehen der Blutgruppen bei den Menschen in frühester Zeit deutet auch das Vorkommen der gleichen Blutgruppen bei den anthropoiden Affen hin.

Wenn somit noch heute schon feststeht, daß sich aus einwandfrei durchgeführten Blutgruppenbestimmungen sichere erbbiologische Schlußfolgerungen ziehen lassen, welche die Gerichte zur Grundlage eines Urteils zu machen berechtigt sind, so ist es doch durchaus nötig, noch weiteres Tatsachenmaterial zu sammeln und statistisch zu verwerten. Nach einem Erlaß des Herrn Reichsministers des Innern vom 17. 4. 39 — $\frac{\text{IV f } 859/39}{4396}$ haben daher die als Blutgruppengutachter zugelassenen Sachverständigen über sämtliche von ihnen ausgeführten Blutgruppengutachten einen jährlichen Bericht zu erstatten, der die Ergebnisse aller durchgeführten Untersuchungen enthält. Auf diese Weise wird es in kurzer Zeit möglich sein, ein außerordentlich großes einwandfreies Material zusammenzubringen, gegen dessen Beweiskraft keine Zweifel mehr erhoben werden können.

Zum Schluß noch einige statistische Angaben:

Die zahlenmäßige Verteilung der Blutgruppen und Blutmerkmale bei unserem Frankfurter Material, berechnet aus rund 6000 Einzeluntersuchungen auf A/B und 2500 Einzeluntersuchungen auf M/N, ist folgende:

0	= 40 Proz.	M	= 29,4 Proz.
A	= 47,5 „	N	= 19,9 „
B	= 8,6 „	M + N	= 50,7 „
AB	= 3,9 „		

Die Zahl der Ausschlüsse betrug, wenn nur ein Mann zur Untersuchung kam, nach dem A/B-System 8 Proz., nach dem M/N-System 14,2 Proz. und nach Abzug der Ausschließungen, die nach beiden Methoden gleichzeitig möglich waren, zusammen 20,7 Proz. Kamen zwei oder mehr Männer zur Untersuchung, so erhöhte sich die Zahl der Ausschlüsse auf 40,8 Proz.

35. S. Olbrich (Frankfurt a. M.):

Eine neue Immunisierungsmethode bei Kaninchen zur Erzielung besonders hochwertiger Anti-N-Seren für die Blutgruppendiagnostik [1]).

Mit 1 Abbildung im Text.

In dem Erlaß des Reichs- und Preußischen Ministers des Innern vom 9. 5. 1938, der sich mit der Benennung von gerichtlichen Blutgruppensachverständigen befaßt, werden die zuständigen Gerichte darauf hingewiesen, daß sie in bestimmten Vaterschafts-Ausschlußfällen, bei denen der Gutachter seinen Ausschluß auf das Nichtvorhandensein des Blutmerkmales N zurückführt, durch einen zweiten Gutachter eine nochmalige Kontrolluntersuchung veranlassen sollen.

Der Minister ging hierbei von der Tatsache aus, daß die Bestimmung des Blutfaktors N in manchen Fällen besondere Schwierigkeiten bereitet, so daß die Heranziehung eines zweiten Gutachters als Obergutachter geboten erscheint.

Seit der Einführung der staatlichen Prüfung der Blutgruppentestseren im April vergangenen Jahres gelten Anti-M- bzw. Anti-N-Immunseren als zulassungsfähig, wenn — neben anderen Voraussetzungen — der unter bestimmten Absorptionsbedingungen erzielbare Titerquotient zwischen M- und N-Testblutkörperchen mindestens 5 Stufen in 50proz. fallender geometrischer Verdünnungsreihe beträgt.

Wie ich an Hand jahrelang durchgeführter eigener Untersuchungen neben anderen Autoren feststellen konnte, und wie auch die Praxis der staatlichen Prüfung ergeben hat, lassen sich nach den üblichen Immunisierungsmethoden Anti-M-Seren von 6—8 Stufen Titerquotient ohne große Schwierigkeiten erzielen.

Bei den Anti-N-Seren verhält es sich jedoch so, daß etwa in demselben Prozentsatz gerade die Mindestqualität von 5 Stufen erreicht

1) Aus dem Staatl. Institut für experimentelle Therapie Frankfurt (Direktor: Geh. Rat Prof. Otto).

wird und sich nur in seltenen Ausnahmefällen, man kann schon sagen „zufällig“, Seren von einem höheren Titerquotienten gewinnen lassen.

Dies ist zweifellos auch der Grund, weshalb die Bestimmung des Blutfaktors N vielfach große Schwierigkeiten bereitet, besonders dann, wenn es sich um weniger empfindliche Blutkörperchen, z. B. bei Säuglingen, alten Leuten, zu alten Blutproben usw. handelt.

Darüber hinaus ist in der Literatur von Crome[1]), Friedenreich[2])[3]) u. a. auch noch ein besonders schwach ausgebildeter Faktor N_2 beschrieben worden, dessen Existenz zwar noch keineswegs allgemein anerkannt ist. Wie eine Reihe namhafter Autoren möchte auch ich betonen, daß mir dieser Faktor N_2 in Zehntausenden von Blutgruppenbestimmungen bisher noch nicht begegnet ist. Vielleicht handelt es sich bei dem von Crome und Friedenreich beschriebenen Faktorentyp auch gar nicht um diesen hypothetischen N_2-Faktor, sondern nur um ein ganz allgemein schwächer ausgebildetes N-Merkmal, das mit offenbar zu schwachen Abgüssen als „N_2“ diagnostiziert wurde.

Wie dem auch sei, an der Tatsache läßt sich jedenfalls nicht zweifeln, daß die N-Bestimmung vereinzelt große Schwierigkeiten bereitet, weshalb auch in dem eingangs angeführten Ministerialerlaß die Kontrolluntersuchung durch einen zweiten Gutachter in bestimmten Ausschlußfällen gefordert wird.

Aus diesem Grunde befasse ich mich schon seit langem mit Versuchen, durch Modifikation der Immunisierungstechnik bessere Anti-N-Seren zu erzielen.

Da alle in früheren Jahren angewendeten Methoden nicht zu dem gewünschten Ziel führten, will ich diese nur ganz kurz streifen, zumal sie im wesentlichen nur Modifikationen der ursprünglich von Landsteiner angewandten Methode sind, die seinerzeit zur Entdeckung der M-N-Faktoren führte.

Bei der Vorbehandlung von Kaninchen mit Blutkörperchenaufschwemmungen konnten wir zwischen iv. und ip. Immunisierung variieren bzw. kombinieren; wir konnten die Anzahl der zweimal in der Woche durchgeführten Einspritzungen von 6 auf 8 bis 12 und darüber steigern; wir konnten die Blutmenge wie die Konzentration der Aufschwemmungen verändern, wir konnten durch alternierende Immunisierung[4]) mit spenderverschiedenen Blutkörperchen derselben Blutgruppenzugehörigkeit unsere Versuche anstellen: Aus der vergleichenden Gegenüberstellung aller gefundenen Absorptionsergebnisse kamen wir dabei zu dem Resultat, daß die 6—8malige Immunisierung in 3—4tägigen Intervallen mit 10—12proz. Aufschwemmungen von Blutkörperchen in einem Gesamtvolumen von je 6—8 ccm die relativ besten Ergebnisse herbeiführte, wobei allerdings die individuelle Absorptionstechnik, über die ich bereits früher[5]) berichtet habe, von großer Bedeutung ist.

Die Heranziehung anderer Versuchstiere, die mir zur Verfügung standen, wie Hammel, Ratten[6]), Meerschweinchen[7]) und Mäuse[8]) erwies sich für die Herstellung von Anti-M- und

1) Z. f. gerichtl. Med. **24**, 167 (1935).
2) Z. f. gerichtl. Med. **25**, 358 (1935).
3) Klin. Wschr. **1937**, 481.
4) Dtsch. med. Wschr. **1938**, Nr 12, 403.
5) Z. Immun.forschg **88**, 63 (1936).
6) Z. Immun.forschg **91**, 242 (1937).
7) Zbl. Bakter. I Orig. **140**, Beih., 269 (1937).
8) Arb. a. d. Staatl. Inst. f. exper. Ther. u. d. Forschungsinst. f. Chemotherapie zu Frankfurt a. M., Heft 36, S. 89, 1938.

Anti-N-Immunseren als ungeeignet, weshalb ich wieder zur Immunisierung von Kaninchen zurückkehrte. Auch die hauptsächlich von Amerikanern bevorzugte Methode der täglichen Immunisierung mit kleinen Mengen über einen längeren Zeitabschnitt hinaus brachte keinen Fortschritt, ebenso war auch die von mir und Nagler versuchte Methode der Röntgenbestrahlung immunisierter Tiere zwecks Auslösung eines unspezifischen Reizes ohne Erfolg. Schließlich sei auch die Nachprüfung der von Hilgermann[1]) vorgeschlagenen Methode erwähnt, durch zweimalige Injektionen an einem Tag, und zwar die 2. auf der Höhe der anaphylaktischen Fieberreaktion 7—8 Std. nach der 1., bessere Immunisierungseffekte zu erzielen, ein Versuch, der ebenfalls negativ ausfiel.

Da all diese Versuche nicht zu dem gewünschten Ziele führten, schlug ich nun einen ganz neuen Weg ein, indem ich von der bisher bei allen Methoden gleichen aktiven Immunisierung auf die kombinierte passive und aktive Immunisierung (Simultan-Impfung) der Kaninchen überging.

Dabei waren für mich hauptsächlich folgende Erwägungen maßgebend:

Nach den bisherigen Immunisierungsmethoden gelang es ohne weiteres sowohl bei den Anti-M-, wie bei den Anti-N-Tieren hohe Immuntiter (bis zu 50000) zu erzielen, jedoch hatten die gebildeten N-Antikörper im Gegensatz zu den M-Antikörpern die Eigenschaft, bei der Absorption der artspezifischen Antikörper durch heterologes M-Blut zum großen Teil mitgerissen zu werden, so daß die durch die Absorption erzielte Titerspanne zwischen M- und N-Blut (der Titerquotient) nicht an die der Anti-M-Seren heranreichte.

Durch die neue Immunisierungsmethode, d. h. durch die vorangegangene passive Immunisierung der Kaninchen hoffte ich, die starke Mitabsorption der homologen Antikörper bei den N-Immunseren zu verringern, in der Annahme, daß die für die Anti-N-Bildung passiv vorbehandelten Kaninchen durch die anschließend erfolgte aktive Immunisierung mit der Bildung besonders widerstandsfähiger N-Antikörper reagieren würde.

Mein Gedankengang erwies sich als richtig.

Bei einer Serie von 6 Kaninchen, die in der Weise vorbehandelt wurden, daß sie in 3—4tägigen Intervallen insgesamt 4mal mit je 1,5 ccm Anti-N-Kaninchenimmunserum (Titerquotient von 4—5 Stufen) iv. gespritzt wurden und anschließend regulär aktiv weiter immunisiert wurden, gelang es, bei der Absorption der einzelnen Seren wesentlich bessere Ergebnisse zu erzielen als nach der bisherigen Methode.

Hierüber konnte ich bereits vergangenen Sommer in der Zeitschrift für Immunitätsforschung[2]) kurz berichten.

Da dieses überraschend gute Ergebnis sich nur auf eine so kleine Versuchsreihe von insgesamt 6 Tieren stützte, es also auch als „zufällig“ anzusprechen war, wurden in einem weiteren Versuch 10 Kaninchen entsprechend vorbehandelt. Sie erhielten ebenfalls 4mal Kaninchen-Immunserum iv., und zwar eine etwas größere Dosis, 4mal 2 ccm eines 5½stufigen Immunserums, an Stelle 4mal 1,5 ccm eines 4—5stufigen bei dem ersten Versuch.

Nach Abschluß der Vorbehandlung wurden die Tiere wie beim 1. Versuch 6mal mit je 6 ccm einer 10proz. Aufschwemmung von N-Blutkörperchen iv. weiter gespritzt und parallel mit diesen vorbehandelten Tieren als Kontrollen 6 nichtvorbehandelte Tiere in gleicher Weise immunisiert. Die gewonnenen Immunseren wurden unter optimalen Absorptionsbedingungen absorbiert und ihre Titerquotienten ermittelt.

1) Klin. Wschr. **1938**, Nr 15, 537.
2) **94**, 247 (1938).

Unter optimalen Absorptionsbedingungen[1]) war jeweils das für jedes Serum einzeln festgestellte Absorptionsoptimum zu verstehen, das aus mehreren in verschiedenen Verdünnungen und mit verschiedenen Absorptionsmengen angesetzten Versuchen ermittelt worden war — der individuellen Eigenart eines jeden Serums entsprechend.

Tabelle I.
Unter optimalen Absorptionsbedingungen erzielter Titerquotient.

	Serum	Verdünnung	Absorbiert im Verhältnis	Erzielter Titerquotient
I. Vorbehandelte Tiere	N 1696	1/20	2:1, 4:1	**6** Stufen
	N 1697	1/10	2:1, 3:1	5½ ,,
	N 1698	1/10	2:1, 3:1	**6** ,,
	N 1699	1/10	2:1, 4:1	**6½** ,,
	N 1700	1/5	2:1, 2:1	5½ ,,
	N 1701	1/8	3:1, 3:1	**6** ,,
	N 1702	1/10	5:2, 6:1	**6** ,,
	N 1703	1/15	2:1, 3:1	**7** ,,
	N 1704	1/10	2:1, 5:1	5½ ,,
	N 1705	1/10	2:1, 1:1	**6** ,,
II. Nicht vorbehandelte Tiere	N 1706	1/20	5:2, 3:2	4½ Stufen
	N 1707	1/10	1:1, 2:1	5 ,,
	N 1708	1/15	2:1, 2:1	4 ,,
	N 1709	1/10	2:1, 2:1, 6:1	5 ,,
	N 1710	1/20	2:1, 3:1	5 ,,
	N 1711	1/10	3:2, 2:1	4½ ,,

Aus der Tabelle I ist zu entnehmen, daß von den 10 passiv vorimmunisierten Tieren 7 mit einem Titerquotient von 6 Stufen und darüber reagierten, während die anderen den staatlichen Mindestanforderungen entsprachen. Von den Seren der 6 nichtvorbehandelten Kontrolltiere zeigte keines einen Titerquotienten von 6 Stufen und nur 3 entsprachen den staatlichen Mindestanforderungen.

Hinsichtlich des Titerquotienten waren also die Seren der vorbehandelten Tiere doppelt bis 4fach so gut, als die nach der früher üblichen Immunisierungstechnik erzielten.

Aus diesen Ergebnissen, die eine völlige Bestätigung meiner früheren Untersuchungen brachten, geht eindeutig hervor, daß die Vorbehandlung von Kaninchen mit spezifischen Immunseren, also eine Art passiver Immunisierung, wesentlich bessere Ergebnisse herbeiführte, als sämtliche früheren auf nur aktiver Immunisierung beruhenden Methoden.

Es galt nun die Frage zu klären, ob auch eine unspezifische Vorbehandlung mit Normalseren ebenfalls zu einer Steigerung der Resistenz der durch die nachfolgende aktive Immunisierung erzielten homologen Antikörper führt.

Zu diesem Zwecke wurden zwei weitere Serien von Kaninchen zu je 6 Tieren mit Normalserum vorbehandelt, und zwar die eine mit je 2 ccm Normal-Kaninchenserum und die andere in gleicher Weise mit je 2 ccm Normal-Rinderserum, 4mal in Abständen von 3—4 Tagen gespritzt.

Daß ein unspezifischer Reiz auch das auslösende Moment sein konnte, war von vornherein durchaus nicht abzulehnen, zumal ich in früheren Versuchen z. B. bei Ratten[2]) feststellen konnte, daß der Faktor N bei diesen Tieren offenbar autochthon vorhanden ist

1) vgl. S. Olbrich, Z. Immun.forschg **88**, 63 (1936).
2) Z. Immun.forschg **91**, 242 (1937).

und dann gegebenenfalls durch den Immunisierungsreiz an sich besonders deutlich zur Entwicklung kommen konnte.

Nach Ablauf dieser Vorbehandlung wurden die beiden Serien regulär mit je 6 ccm einer 10proz. Aufschwemmung von N-Blutkörperchen desselben Spenders wie bei den beiden ersten Serien und außerdem zur weiteren Kontrolle eine 3. Serie von 5 Kaninchen, die noch nicht vorbehandelt worden waren, immunisiert.

Die Vorbehandlung mit Normal-Kaninchenserum wurde iv. durchgeführt, die mit Normal-Rinderserum jedoch nur zum Teil. Da nämlich nach der 3. iv. Injektion 2 Tiere nach 1 bzw. 6 Std. im anaphylaktischen Schock zugrunde gingen, wurde die 4. Injektion bei den restlichen 4 Tieren ip. gegeben. Die abschließende aktive Immunisierung erfolgte indes bei allen 3 Serien wieder iv.

Das Ergebnis dieser Untersuchungen hinsichtlich des unter optimalen Absorptionsbedingungen erzielten Titerquotienten zeigt die Tabelle II.

Tabelle II.
Unter optimalen Absorptionsbedingungen erzielter Titerquotient.

	Serum	Verdünnung	Absorbiert im Verhältnis	Erzielter Titerquotient
I. Mit Normal-Kaninchenserum vorbehandelte Tiere	N 1748	1/10	2:1, 2:1	5 Stufen
	N 1749	1/15	1:1, 3:2	5 ,,
	N 1750	1/10	3:2, 2:1	5 ,,
	N 1751	1/15	2:1, 4:1	5½ ,,
	N 1752	1/20	3:2, 4:1	4½ ,,
	N 1753	1/20	2:1, 3:1	4½ ,,
II. Mit Normal-Rinderserum vorbehandelte Tiere	(N 1754 †)			
	N 1755	1/10	2:1, 3:1	2 Stufen
	N 1756	1/5	3:2, 3:2	5 ,,
	N 1757	1/10	3:2, 3:2, 2:1	5 ,,
	N 1758	1/15	2:1, 2:1	4 ,,
	(N 1759 †)			
III. Nicht vorbehandelte Tiere	N 1760	1/20	3:2, 3:1	4½ Stufen
	N 1761	1/10	2:1, 2:1, 4:1	3½ ,,
	N 1762	1/10	2:1, 3:2, 3:1	4½ ,,
	N 1763	1/20	3:2, 5:2	5 ,,
	N 1764	1/10	2:1, 3:2, 3:2	5½ ,,

Aus der Tabelle II ergibt sich, daß die unspezifische Vorbehandlung von Kaninchen mit Kaninchennormal- bzw. Rindernormal-Serum, keine wesentlichen Unterschiede im Vergleich zu nicht vorbehandelten Tieren nach sich zieht, wenn man von dem Serum N 1755 absieht, bei dem ein Titerquotient von nur 2 Stufen offenbar auf ein individuell besonders schwer immunisierbares Tier zurückzuführen ist. Die Ergebnisse bei den Kontrolltieren entsprechen ungefähr den mit Normalseren vorbehandelten und etwa den Resultaten, die auf Grund früherer Versuche bei der aktiven Immunisierung im allgemeinen erzielt wurden.

Eine zusammenfassende Uebersicht in Form einer graphischen Darstellung über diese Untersuchungen vermittelt die Abbildung 1.

Die Abbildung 1 zeigt, daß unter optimalen Absorptionsbedingungen nach der alten aktiven Immunisierungsmethode nur rund 53 Proz. der Seren der staatlichen Mindestanforderung (Titerquotienten von 5 Stufen) entsprechen, und zwar haben rund 30 Proz. einen Titerquotient von 5 Stufen, rund 18 Proz. einen solchen von 5½ Stufen und nur 4,4 Proz. einen von 6 Stufen.

Im Gegensatz dazu hat die neue kombinierte passive und aktive Immunisierungsmethode einen 100proz. Immunisierungs-bzw. Absorptionseffekt, der bei der relativ geringen Anzahl der untersuchten Seren für diese wohl als zufällig anzusprechen ist, da bei allen biologischen Versuchen ein tatsächlich 100proz. Effekt wohl nie zu erreichen ist.

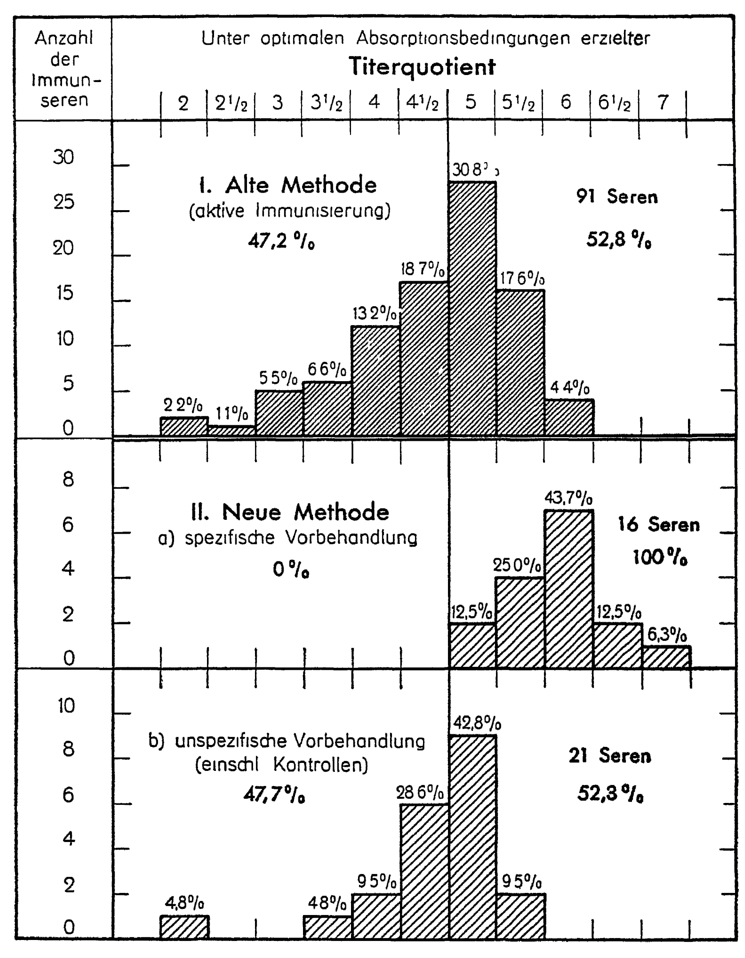


Abb 1.

Was aber als viel wesentlicher imponiert, ist die etwa 10fach so hohe Ausbeute (43,7 Proz.) an 6-Stufen-Seren, die sich durch meine neue Methode erzielen läßt. Darüber hinaus konnten unter 16 Seren 2 von einem Titerquotienten 6½ und 1 von einem Titerquotienten 7 gewonnen werden, was nach der alten Methode und, soweit Literaturangaben vorliegen, bisher bei Anti-N-Seren noch in keinem Falle gelungen ist.

Daß dieses Ergebnis nicht auf eine unspezifische Vorbehandlung mit Serum an sich zurückzuführen ist, sondern auf spezifischer Vorbehandlung mit homologem Immunserum beruht, zeigt der untere Abschnitt der Abbildung 1, nach der die unspezifische Vorbehandlung mit

Normalkaninchen- bzw. Normalrinderserum nur etwa zu denselben Resultaten führt wie bei den nach der früheren aktiven Immunisierungsmethode gespritzten Tieren.

Die Qualität der nach der neuen Methode gewonnenen Seren ist also durchschnittlich um 1—2 Titerstufen besser, d. h. den früheren Seren um 100 bzw. 200 Proz. überlegen.

Ich glaube, damit den Beweis erbracht zu haben, daß die von mir angegebene und durchgeführte Methode der kombinierten passiven und aktiven Immunisierung von Kaninchen tatsächlich zur Erzielung besonders hochwertiger Anti-N-Seren geeignet ist und einen nicht zu unterschätzenden Fortschritt für die gerichtliche Blutgruppendiagnostik, namentlich bei zweifelhaften Fällen, bedeutet.[1])

Aussprache.

Wildführ (Dresden):

Ich kann den Ausführungen meines Vorredners im großen und ganzen zustimmen. In der Tat stößt die Gewinnung brauchbarer Anti-N-Immunseren auf erheblich größere Schwierigkeiten als es bei Anti-M der Fall ist. Im Gegensatz zu amerikanischen Autoren konnte in meinen Laboratorien bei sorgfältiger Immunisierung ohne weitere Hilfsmittel 5- und 6- bis 7stufiges, ja sogar ein 8stufiges Anti-M-Serum, das auch bei der staatlichen Prüfung als solches anerkannt wurde, gewonnen werden. Bei der Anti-N-Immunisierung ließ ich Hilfsmittel anwenden. Zunächst angeregt durch die Arbeit Hilgermanns in der klinischen Wochenschrift 1938, in welcher über eine 100proz. Gewinnung brauchbarer Anti-M- und Anti-N-Seren mit Hilfe anaphylaktischen Fiebers berichtet wird, wendete ich für Anti-N die gleiche Methode zunächst bei 6 und dann nochmals bei 14 Versuchstieren an. Das Resultat dieser Versuche war eine große Enttäuschung. Es wurde zwar in etwa 60 Proz. der Fälle eine enorme Titersteigerung erreicht, unter anderem bis zu 1:25000, jedoch wurde die Absorbierbarkeit der Seren keineswegs günstiger, so daß mit dieser Methode die Ergebnisse der ersten Immunisierungen überhaupt nicht gebessert wurden. Die günstigen Ergebnisse Hilgermanns kann ich nicht bestätigen.

Ich ging dann auf Grund der in der Zeitschrift für Immunitätsforschung 1938 veröffentlichten Arbeit Olbrichs zu der Methode der Vorimmunisierung mit Anti-N-Immunserum über. Das verwendete Serum war $4^1/_2$stufig. Es wurden 6mal 2 ccm dieses Serums gegeben. Die Vorimmunisierung dauerte 3 Wochen. Die erste Versuchsreihe umfaßte 8, die zweite Versuchsreihe 10 Tiere. Zu gleicher Zeit wurde zu der zweiten Versuchsreihe als Parallelversuch ebenfalls eine Serie von 10 Kaninchen gleicher Rasse und gleichen Gewichtes ohne Vorimmunisierung mit dem gleichen O-N-Blut behandelt. Die Ergebnisse sprachen zugunsten der Vorimmunisierung mit Anti-N-Serum. So lieferte die Serie ohne Vorimmunisierung 20 Proz. brauchbare Anti-N-Seren und die Serie mit Vorimmunisierung 60 Proz. Unter diesen brauchbaren Seren war eins 6stufig, zwei $5^1/_2$stufig, eins glatt 5stufig, zwei allerdings knapp 5stufig. Ich gebe aber gerne zu, daß man unter den von Olbrich geforderten optimalen Absorptionsbedingungen vielleicht noch eine Steigerung von durchschnittlich $^1/_2$—1 Stufe erzielt hätte.

Was die Frage der Bestimmung der M- und N-Faktoren anlangt, so betone ich ebenfalls die erheblich größeren Schwierigkeiten bei der Bestimmung des N-Faktors, infolge von zuweilen schwächerer Ausbildung dieses Merkmals. Man mag zu dem N_2 Friedenreichs stehen wie man will, mag es anerkennen oder auf zu schwache Seren zurückführen, das ist vollkommen gleichgültig gegenüber der Tatsache, daß es bei N wirklich schwächer ausgebildete Merkmale gibt als es bei M der Fall ist. Im allgemeinen reichen zwar für die Faktorenbestimmungen 5stufige Seren vollkommen aus. Es wäre jedoch wünschenswert, wenn in Zweifelsfällen — so wie sie u. a. in dem von Olbrich zitierten Ministerialerlaß zwecks Heranziehung eines Obergutachters aufgeführt sind — vom Obergutachter Seren verwendet würden, die höher als 5stufig sind. Bei einem 6-Stufenserum z. B. steigt die Empfindlichkeit gegenüber einem 5-Stufenserum um 100 Proz., und somit auch die Sicherheit gerichtlicher

1) Anmerkung bei der Korrektur: Inzwischen konnte ich durch weitere Steigerung der Immunisierungsdosen meine Resultate noch weiter verbessern, worüber ich in der Zeitschrift für Immunutätsforschung ausführlich berichten werde.

Blutgruppenbefunde. Verwendet der Obergutachter in solchen Zweifelsfällen auch nur 5stufige Seren, so kann er auch nur das gleiche aussagen, wie der erste Gutachter, da ihm dann ebenso wie diesem die Moglichkeit fehlt, eventuell vorhandene schwache N-Merkmale aufzudecken. Ich möchte daher anregen, daß die obligatorische Verwendung von Immunseren über 5 Stufen für diese Zweifelsfälle staatliche Vorschrift wird.

Clauberg (Berlin):

Die Einengungsseren zum Nachweis sog. defekter N-Faktoren (N_2) bieten keine erhöhte diagnostische Sicherheit, sie stellen eher eine zusätzliche Fehlerquelle dar. Die einschlägigen Bestimmungen der ministeriellen Richtlinien zur Durchfuhrung forensischer Blutgruppenuntersuchungen müssen daher fallen.

Was die Hilgermannsche Methodik zur Gewinnung hochwertiger Anti-N-Seren anbetrifft, so brachte sie auch uns keine Verbesserung der Ausbeute.

In letzter Zeit trat an mich die Frage heran, ob bei blutgruppenverschiedenen (also zweieiigen) Zwillingen ein vermeintlicher Erzeuger, der nach den Regeln zur Blutgruppenvererbung „offenbar unmöglich" Vater des einen der Zwillingskinder sein kann, damit auch „offenbar unmöglich" Vater des zweiten Kindes ist. Im Hinblick darauf, daß Ueberschwängerung nicht völlig ausschließbar ist, glaubte ich diese Frage nicht unbedingt bejahen zu können. Da der einzelne Erfahrungen nach dieser Richtung nur in spärlichem Umfange machen kann, dürfte es sich empfehlen, derartige Gegebenheiten laufend an zentraler Stelle zu sammeln und von Zeit zu Zeit darüber berichten zu lassen.

Den gleichen Vorschlag möchte ich noch aus anderem Anlaß machen. Die zunehmende forensische Bedeutung der Untergruppen lenkt die Aufmerksamkeit auf die zuweilen recht schwierige Unterscheidung innerhalb der Doppelgruppe AB, bei der bekanntlich der A-Anteil an sich „gedrückt" sein kann, so daß unter Umständen ein A_1 als A_2 imponiert, zumal bei Säuglingen. Persönliche Beobachtungen rechtfertigen die Annahme, daß bei derartigen Vorkommnissen im frühesten Lebensalter (analog dem Verhalten der Gruppenagglutinine) eine gewisse „Ausreifung" der Untergruppeneigenschaft möglich ist, so daß ein anfänglich nicht sicher entscheidbarer Fall mehrere Monate später eindeutige Ergebnisse liefern kann. Erfahrungsaustausch darüber erscheint mir wünschenswert.

F. v. Bormann (Bremen).

K. Laubenheimer (Frankfurt a. M.) Schlußwort.

36. Peter Dahr (Köln):

Erfahrungen bei Massenuntersuchungen mit der Trockenblutreaktion auf Lues[1]).

1937 begannen in einigen Gauen der NSDAP, darunter im Gau Köln-Aachen, auf Veranlassung der DAF sogenannte Betriebsuntersuchungen, die von den beim Amt für Volksgesundheit zugelassenen Aerzten durchgeführt werden. Bei diesen Betriebsuntersuchungen werden die schaffenden Volksgenossen in Fabriken und sonstigen Arbeitsbetrieben zwecks Erkennung gesundheitlicher Schädigungen bei scheinbar gesunden Menschen ärztlich untersucht. Allein im Gau Köln-Aachen werden dabei auch Untersuchungen des Blutes auf Lues vorgenommen, und zwar mit der durch meine Untersuchungen am Kölner Hygienischen Institut und der Kölner Beratungsstelle für Geschlechtskranke in Deutschland bzw. in Europa überhaupt bekannt. gewordenen von Chediak angegebenen Trockenblutreaktion (TBR). Bei

1) Aus dem Hygienischen Institut der Universität Köln/Rh. (Direktor: Prof. Dr. Reiner Müller).

dieser Reaktion wird bekanntlich ein an einem Objektträger angetrockneter Tropfen Blut nach Auflösung mit 3,5proz. NaCl-Lösung unter Verwendung des Extraktes für die MKR II untersucht. Auf die technischen Einzelheiten der Reaktion, insbesondere unter Berucksichtigung ihrer Anwendung bei Massenuntersuchungen, wie sie seit nunmehr fast 2 Jahren im Kölner Hygienischen Institut durchgeführt werden, möchte ich hier nicht weiter eingehen; ich verweise diesbezuglich auf einen Aufsatz in der Zeitschrift „Die Technische Assistentin" 1938, Nr. 5.

Ich möchte hier lediglich auf die erfreulichen Erfolge unserer bisherigen Untersuchung von fast 211000 Blutproben hinweisen und gleichzeitig ganz kurz auf die Organisation unserer Massenuntersuchungen eingehen.

Die an den Objektträgern angetrockneten Blutproben werden dem Hygienischen Institut von den zahlreichen Untersuchungsstellen in den Betrieben des gesamten Gaugebietes Köln-Aachen laufend zugesandt. Zum Verschicken der Blutproben mit der Post haben sich uns nach den Angaben von Prof. Reiner Müller konstruierte Holzkästchen, die 12 Objektträger fassen, bestens bewährt.

Den eingesandten Blutproben ist eine Begleitliste, die Namen, Alter und Anschrift der Untersuchten angibt, in doppelter Ausführung beigelegt. Auf dieser Begleitliste wird bei uns das Ergebnis der Untersuchung eingetragen. Die Begleitliste geht dann zurück an die zuständige Kreisverwaltungsstelle des Amtes für Volksgesundheit. Das Doppel der Liste geht an die Kölner Beratungsstelle für Geschlechtskranke, wo festgestellt wird, ob die Untersuchten mit positivem Ergebnis in der dort geführten Geschlechtskrankenkartei schon enthalten sind. Ist dies nicht der Fall, veranlaßt der Leiter der Beratungsstelle, Herr Medizinalrat Dr. Morschhäuser, eine Nachuntersuchung des Venenblutes in einem serologischen Laboratorium.

Die Zahl der im Kölner Hygienischen Institut seit Beginn der Betriebsuntersuchungen, am 15. 5. 37 bis zum 1. 3. 39 unter meiner Leitung untersuchten Blutproben beträgt insgesamt 210730. Davon zeigten einen mehr oder weniger stark positiven Ausschlag 2740, d. i. etwa 1,3 Proz.

Nach der Stärke des Reaktionsausfalles verteilen sich diese 2740 positiven Proben folgendermaßen:

± = 451 ++ = 637
\+ = 937 +++ = 715

Von diesen 2740 Proben wurden bisher durch die Venenblutuntersuchung einer Nachprüfung unterzogen 1968. Die Verteilung auf die verschiedenen Reaktionsstärken und die Ergebnisse der bisherigen Nachuntersuchungen zeigt folgende Tabelle:

± = 316,	davon bei Nachuntersuchung	negativ 249	positiv 67 = 21 Proz.
+ = 644,	„ „	negativ 338,	positiv 306 = 48 „
++ = 463,	„ „	negativ 98,	positiv 365 = 79 „
+++ = 545,	„ „	negativ 32,	positiv 513 = 94 „
Summe 1968,	davon bei Nachuntersuchung	negativ 717,	positiv 1251 = 63,6 Proz.

Wir sehen, daß die ±- und +-Fälle bei der Nachuntersuchung in einem relativ hohen Hundertsatz keine Bestätigung finden. Das hat hier seine besonderen Gründe. Nach meinen Erfahrungen schwindet die Reaktionsfähigkeit von angetrockneten Syphilisblutproben um so mehr, je größer der Zeitraum zwischen Blutentnahme und Untersuchung ist. Eine Probe, die, am Entnahmetag mit der TBR untersucht, einen +++-Ausschlag gibt, reagiert daher nach 6—8 Tagen nur noch + oder ±. Für die Untersuchungsstellen besteht nun zwar die Vorschrift, die

Blutproben am Tage der Abnahme an uns abzusenden, aber trotzdem gelangen auch hin und wieder ältere Blutproben zur Untersuchung. Es werden deshalb alle auch noch so schwach positiv oder zweifelhaft gefundenen Ergebnisse von mir zur Nachuntersuchung herausgegeben, wobei ich mir bewußt bin, daß darunter von vorneherein eine große Anzahl von Proben sich befindet, die bei der Nachuntersuchung nicht bestätigt werden. Dadurch wird zwar die relative Erfolgsstatistik unserer Untersuchungen verschlechtert; es kommt aber bei diesen Untersuchungen ja nicht darauf an, die Zuverlässigkeit der TBR zu beweisen oder nachzuprüfen; das ist in zahlreichen anderen Untersuchungen, wo die Bedingungen der Vergleichsuntersuchungen günstiger waren, schon erfolgt. Es kommt auch nicht darauf an, eine schöne Statistik zu erzielen, sondern es kommt uns lediglich darauf an, möglichst viele Syphilitiker aus der Menge der Untersuchten herauszufinden. Ob dabei ein paar Personen mehr vergeblich nachuntersucht werden, spielt deshalb keine Rolle: und die 67 Syphilitiker, die nach der oben angeführten Tabelle mit der TBR nur ± reagierten, wären nicht erfaßt worden, wenn wir die ±-Fälle nicht zur Nachuntersuchung angegeben hätten.

Trotzdem es, wie schon gesagt, bei diesen Reihenuntersuchungen gar nicht darauf ankommt, eine für die TBR günstige Statistik zu erzielen, möchte ich doch kurz erklären, warum wir bei unsern Untersuchungen so viele unspezifisch schwach oder zweifelhaft positiven Ergebnisse erhalten haben.

1. Bei unseren täglich durchschnittlich 700—800 Untersuchungen, die sich manchmal bis zu 1200 Proben täglich erhöhen, war es nicht immer möglich, die Proben in so kleinen Gruppen zu untersuchen, daß die Ablesung aller Proben immer etwa 1 Std. nach Zugabe der Extraktverdünnung erfolgen konnte. Die relativ häufigen unspezifisch schwach positiven Ergebnisse sind also, wie das auch bei der mikroskopischen Ablesung der MKR der Fall sein kann, durch die teilweise verspätete Ablesung der Proben bedingt.

2. Liegt oft eine große Zeitspanne (und zwar Wochen bis Monate) zwischen unserer Untersuchung mit der TBR und der Nachprüfung des Serums, wodurch teilweise die Differenz erklärt sein kann.

3. Besteht die Möglichkeit, daß ein Teil der nicht bestätigten schwach positiven Ausschläge nur scheinbar unspezifisch sind, da nicht nur durch meine eigenen Untersuchungen, sondern auch durch die umfangreichen Untersuchungen von Stahn im Hygienischen Institut in Bremen und vor allem von Sticht in der Münchener Hautklinik feststeht, daß bei latenter Lues die TBR häufiger positiv ist als selbst empfindliche Serumproben. Möglicherweise sind daher eine Anzahl der serologisch nicht bestätigten positiven Ausschläge der TBR in Wirklichkeit durch eine tatsächlich vorhandene Lues bedingt.

Wie schon erwähnt, sind bis zum 1. 3. 39 noch nicht alle 2740 mit der TBR positiv gefundenen Personen nachuntersucht worden, sondern nur 1968. Wären alle 2740 nachuntersucht, dann hätten wir durch unsere bis 1. 3. 39 durchgeführten, also etwa 1¾ Jahre währenden Untersuchungen, wenn wir für die bisher noch nicht nachgeprüften Fälle eine gleiche Bestätigungshäufigkeit annehmen, 1741 Syphilitiker erfaßt. Eine solche Zahl können wir praktisch auch schon als erfaßt gelten lassen. Wir haben somit bei 0,83 Proz. aller bisher Untersuchten eine bis dahin unbekannte Lues nachgewiesen. In Wirklichkeit ist aber die Zahl der entdeckten Syphilitiker noch größer; 67mal wurde nämlich durch die Kölner Beratungsstelle in den Familien der gefundenen Syphilitiker noch kongenitale Lues bei Kindern oder Lues beim Ehegatten festgestellt.

Eine Verteilung der gefundenen Syphilitiker auf die verschiedenen Altersklassen zeigt folgende Tabelle:

Alter	♂	♀	Zusammen	Proz.
—20	31	42	93	7,0
20—25	27	41	68	5,1
25—30	64	47	111	8,1
30—35	100	59	159	11,9
35—40	170	62	233	17,5
40—45	151	64	215	16,0
45—50	129	29	158	11,8
50—55	126	16	142	10,6
55—60	96	9	105	7,9
60—	50	5	55	4,1

Ich darf wohl ruhig behaupten, daß es mit einer anderen Untersuchungsmethode, insbesondere mit einer Serumprobe nicht gelungen wäre, derartige Massenuntersuchungen durchzuführen. Zunächst, was die Blutgewinnung betrifft und dann, was die Kosten für die Durchführung der Untersuchungen angeht. Es wäre wohl sicherlich nicht möglich gewesen, bei den über 210000 ärztlichen Untersuchungen in den Betrieben Venenpunktionen durchzuführen; das wäre sowohl an der Unmöglichkeit der technischen Durchführung wie auch an der Weigerung zahlreicher Untersuchter gescheitert. Die Anwendung der TBR ermöglichte dagegen eine leichte, unauffällige und wenig belästigende Blutentnahme mit dem Schnäpper aus der Fingerbeere oder dem Ohrläppchen. Was die Kosten betrifft, so hat das Gauamt für Volksgesundheit in Köln die Kosten für eine Probe einschließlich Sach-, Versand- und Personalkosten — ich arbeite mit 2 eigens zu diesem Zweck gestellten technischen Assistentinnen und 1 Laboranten — auf 5—6 Pfg. berechnet.

Die Tatsache, daß wir mit diesen geringen Mitteln und innerhalb dieser Zeit mit diesem Erfolge über 200000 Personen auf Lues untersuchen und dabei über 1700 als Syphilitiker feststellen konnten, läßt die TBR, worauf schon Prof. Reiner Müller 1938 in einem Aufsatz in der Münch. med. Wschr. hinwies, tatsächlich als ein Hilfsmittel zur Ausrottung der Lues erscheinen. Stellen wir uns vor, daß entsprechend dem Untersuchungsbereich unseres Instituts von etwa 4 Millionen Menschen in unserm etwa 80-Millionen-Deutschland insgesamt 20 derartige Untersuchungsstellen, einem Untersuchungsamt oder Hygienischen Institut wie bei uns angegliedert, beständen, dann würde durch die in ähnlicher Weise wie bei uns durchgeführte Untersuchung scheinbar gesunder Bevölkerungskreise jährlich etwa 20000 Syphilitiker ermittelt. Würde aber der Bereich einer derartigen Untersuchungsstelle verkleinert, etwa auf 2 Millionen Menschen, und somit 40 Untersuchungsstellen eingerichtet, dann könnte, entsprechend der höher geleisteten Untersuchungszahl, mit der jährlichen Erfassung von 40000 Syphilitikern gerechnet werden. Die Blutuntersuchungen wären im Rahmen der heutzutage bei uns periodisch wiederkehrenden ärztlichen Untersuchungen, wie bei Eintritt in die Schule, HJ, Arbeitsdienst, Wehrmacht, Beantragung des Ehestandsdarlehens usw. leicht mitdurchzuführen.

Wenn man bedenkt, was man sonst aus öffentlichen Mitteln zur Bekämpfung der Geschlechtskrankheiten aufwendet, z. B. nur für die Ueberwachung der Prostituierten und ihre Behandlung, dann wäre die Einrichtung derartiger Untersuchungsstellen im ganzen Reich, gemessen an dem zu erwartenden Erfolg, eine geringe Mühe und eine geringe geldliche Ausgabe.

Man bedenke, bei wieviel von den 1740 von uns in 1¾ Jahren erfaßten Syphilitikern durch eine noch aussichtsreiche spezifische Behandlung späteres Siechtum vielleicht vermieden werden kann. Die Kosten, die dadurch der Oeffentlichkeit erspart werden, sind sicher ungleich höher als die durch die vorbeugende Untersuchung großer Bevölkerungskreise entstehenden. Man bedenke, in wie vielen Fällen durch Erfassung der 1740 Syphilitiker vielleicht eine Ansteckung der Ehegatten oder Verlobten oder die Erzeugung syphilitisch zur Welt kommender Kinder vermieden wird. Neben den wirtschaftlichen Erwägungen ist es also vor allem die Erfordernis einer vorausblickenden gesundheitlichen Vorbeugung, die der größeren Anwendung der TBR bei der Untersuchung großer Bevölkerungskreise auf Lues das Wort redet. Daß die Erfassung und Behandlung all dieser Syphilitiker auch bevölkerungspolitisch und wehrpolitisch von Bedeutung ist, sei nur angedeutet.

Ich bin überzeugt, daß in Anbetracht der so günstigen Ergebnisse der Massenuntersuchungen auf Lues mit der TBR im Gau Köln-Aachen in absehbarer Zeit diese Untersuchungen weiteste Anwendung finden werden, vielleicht in der eben von mir angedeuteten Weise.

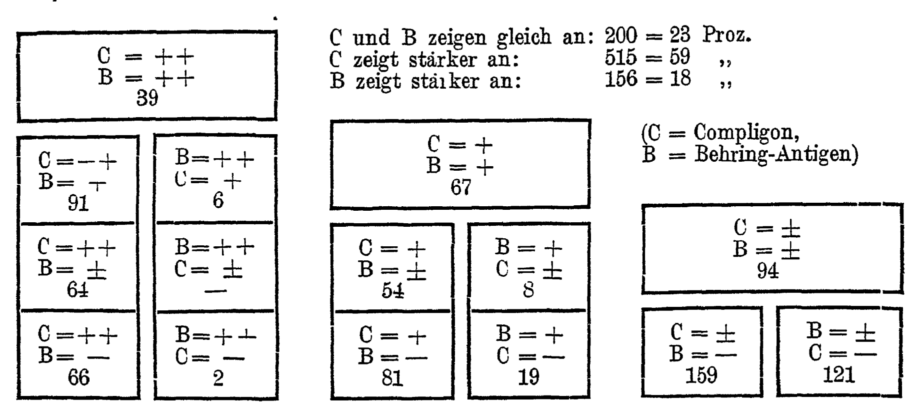
Da die vorbeugende Gesundheitspflege die besondere Aufgabe des Hygienikers darstellt, möchte ich gerade in diesem Kreise auf die Bedeutung der TBR im Sinne einer vorbeugenden Bekämpfung der Lues und ihrer Folgekrankheiten und im Sinne einer Ausrottung der Lues hingewiesen haben.

37. Krehnke (Kiel):

Ergebnisse der vergleichenden serologischen Untersuchungen bei Gonokokken-Komplementbindungsreaktionen [1]).

Seit einer Reihe von Jahren werden auf der Hygienischen Abteilung des Sanitätsamtes der Marinestation der Ostsee bei jeder Einsendung, ganz gleich wie die Diagnose lautet, neben 3 Reaktionen auf Lues auch 2 Go-Reaktionen angesetzt. Es wurden das Compligon von Schering und das Behring-Antigen an mehreren 10000 Fällen geprüft und miteinander verglichen. Eine Uebersicht über 8000 Einsendungen, die Ruge und Reicke 1936 veröffentlicht haben, ergab eine gewisse Ueberlegenheit des Behring-Antigens. Nachdem in der letzten Zeit besonders genau der richtige Zeitpunkt der Lösung und einige Kleinigkeiten in der Technik, die aber für den Ausfall der Reaktion von Bedeutung sind, beachtet wurden, haben wir noch einmal einen Vergleich zwischen den beiden Antigenen gezogen. Es wurden 10000 Einsendungen aus der Zeit von Mitte 1937 bis Ende 1938 verglichen. Von diesen 10000 Blutproben lautet die Diagnose in 2108 Fällen auf Go. Davon zeigten überhaupt an, also beide Antigene gleich, oder nur eins von beiden, 871 Fälle = 41,2 Proz. Wie verteilen sich nun diese 871 positiven Reaktionen auf die beiden Antigene? Darüber gibt folgende Zusammenstellung Aufschluß.

1) Aus der Hygienischen Abteilung des San.-Amtes der Marinestation der Ostsee, Kiel-Wik (Leiter: Flottenarzt Prof. Dr. Ruge).

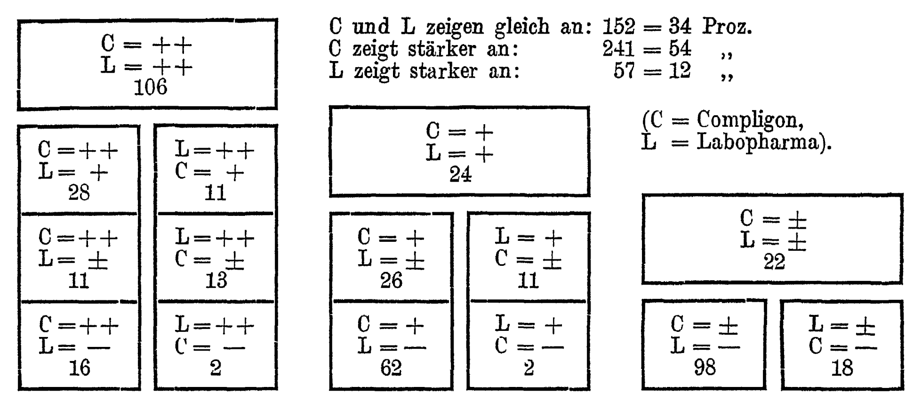


Es ergibt sich also eine klare, eindeutige Ueberlegenheit des Compligons: von den 871 positiven Reaktionen zeigte das Compligon in 715 Fällen (82 Proz.) mit dem Behring-Antigen gleich oder besser als dieses an, während das Umgekehrte nur 356mal (39,7 Proz.) der Fall war. Bei Ausschaltung aller schwachen und daher nicht eindeutigen Reaktionen, die in der Aufstellung als ± angegeben sind, kommt man zu einer Gesamtzahl von 497 positiven Reaktionen. Diese setzt sich aus 106 Fällen zusammen (21,3 Proz.), in denen Compligon und Behring-Antigen gleich stark anzeigen, dazu kommen 356 Reaktionen, in denen das Compligon dem Behring-Antigen überlegen ist (71,6 Proz.) und schließlich nur 35, bei denen Behring-Antigen bessere Werte als Compligon ergibt (7,1 Proz.).

Soll jetzt beurteilt werden, in wieviel Fällen es unspezifische Anzeigen gegeben hat, so ist zu sagen, daß diese Frage bei dem zur Verfügung stehenden Material nicht ganz vollständig beantwortet werden kann. Es konnte eine Reihe von Reaktionen nicht mit Sicherheit zu den spezifischen oder unspezifischen gerechnet werden, da der Vermerk fehlte, ob früher einmal eine Go vorgelegen hat. Außer den eben erwähnten 871 positiven Reaktionen war bei weiteren 606 eine Komplementablenkung eingetreten. Davon wurden zunächst 137 ausgeschlossen, bei denen Erkrankungen vorlagen, die erfahrungsgemäß häufiger unspezifische Reaktionen hervorrufen: Lues, Ulcus molle, Hautleiden, fieberhafte Erkrankungen. Das würde eine Unspezifität des Compligons von 1 Proz. und des Behring-Antigens von 0,5 Proz. ergeben. Es verbleiben 469 Fälle, in denen, wie gesagt, die erforderlichen genauen Angaben fehlten, in den meisten Fällen handelte es sich aber bestimmt um Kontrollen von vor kurzer Zeit aus dem Lazarett entlassenen Patienten, die dort wegen Go gelegen hatten. Auch diese 469 Fälle verteilen sich in derselben Weise, wie wir es in der ersten Aufstellung gesehen haben und bestätigen die Ueberlegenheit des Compligons.

Durch eine in der letzten Zeit erschienene Arbeit, in der das Labopharma-Antigen an 300 Seren von Go-Patienten geprüft und besser als Compligon befunden wurde, haben wir auch noch zum Vergleich neben dem Behring-Antigen und dem Compligon das Labopharma-Antigen mitlaufen lassen. Hervorzuheben ist die etwas größere Einfachheit beim Arbeiten mit dem letzteren, da neben der Kontrolle nur 2 verschiedene Antigen-Arbeitsnummern anzusetzen sind, während bei dem Compligon 3 Röhrchen infolge der Antigenverdünnungen 1 + 3, 1 + 4, 1 + 5 und bei dem Behring-Antigen sogar 4- für 5-, 10-, 20- und 40fache Serumverdünnung erforderlich sind. Das Arbeiten mit dem Behring-Antigen ist wegen der Notwendigkeit, jedes einzelne

Serum durchpipettieren zu müssen, besonders bei großen Versuchsreihen sehr unbequem und zeitraubend. Wir haben alle 3 Reaktionen bei 2500 Seren angesetzt, von denen 920 wegen Go eingesandt worden waren. Davon fielen bei 500 eine oder mehrere der Reaktionen spezifisch positiv aus, das sind 55,5 Proz. oder bei Fortlassen der schwachen Reaktion 341 = 38 Proz. Betrachten wir jetzt die Verteilung der 3 Antigene auf diese Zahl. Von den 500 positiven Ausfällen zeigte das Compligon 408mal (81,6 Proz.) an, Labopharma war in 254 und Behring-Antigen in 257 Fällen positiv (je 51 Proz.). Bei Ausschaltung der schwachen Reaktionen behält das Compligon mit 83 Proz. positiven Anzeigen seinen Vorteil gegenüber dem Behring-Antigen mit nur 22,6 Proz. starken Reaktionen und dem Labopharma mit 58 Proz. stark positiven Ausfällen. Das Verhältnis von Labopharma zum Behring-Antigen verschiebt sich also deutlich zugunsten des Labopharma, die Ueberlegenheit des Compligon wird dadurch nicht in Frage gestellt. Wie wir in der ersten Zusammenstellung genau die einzelnen Ergebnisse des Vergleichs zwischen Behring-Antigen und Compligon dargestellt sahen, so wollen wir jetzt denselben eingehenden Vergleich zwischen Compligon und Labopharma betrachten.



Prüfen wir die Spezifität, so finden wir 84 unspezifische Ausfälle, die sich auf alle 3 Antigene verteilen, das sind 3,4 Proz. oder bei Fortlassen der schwachen Reaktion 0,9 Proz. Unter Einschluß aller Ergebnisse erhalten wir bei Compligon eine Unspezifität von 2,3 Proz., beim Labopharma von 1 Proz. und beim Behring-Antigen von 1,2 Proz. Bei Fortlassen der schwachen Reaktionen verringert sich die Unspezifität beim Compligon auf 0,6 Proz., beim Labopharma-Antigen auf 0,4 Proz. und beim Behring-Antigen auf 0,3 Proz.

Wenden wir uns jetzt der Frage zu, in wieviel Fällen man überhaupt bei der frischen unbehandelten Go positive Ergebnisse erhält. Bei den meisten Patienten, die mit einer frischen Go in Behandlung kommen, ist keine Komplementablenkung festzustellen. Von 297 frischen Go-Fällen fanden wir nur bei 58 = 19,5 Proz. eine meist auch nur schwache Reaktion. Andere Untersucher geben nun bedeutend größere Zahlen von Fällen an, in denen sie bei der unbehandelten Go positive Reaktionen gefunden haben. Es werden 60—90 positive Ausfälle auf 100 frische Go-Erkrankungen beschrieben. Unsere dagegen sehr schlecht erscheinenden Ergebnisse dürften in folgendem begründet sein: 1. es kommen bei der Wehrmacht die Patienten früher in die Hand des Arztes als im bürgerlichen Leben, das Blut ist zur Untersuchung oft schon am ersten oder zweiten Tag des Bestehens klinischer Symptome zur Untersuchung entnommen worden, und die Aussicht, eine positive Re-

aktion zu erhalten, hängt nicht so sehr von der Länge der Inkubationszeit, als vielmehr von dem Vorhandensein der klinischen Merkmale ab. 2. Von anderen Untersuchern wird oft die Reaktion in der Form angestellt, daß die K.B.R. mit einer Reihe von Seren Go-Kranker angesetzt wird und zur Kontrolle nur 1 oder 2 negative Seren mitlaufen. Wir halten die so erzielten Ergebnisse nicht für einwandfrei, denn 1 oder 2 negative Seren sind keine Kontrolle, 10—20 müssen als Mindestforderung angesehen werden. Bei uns werden, wie bereits zu Anfang betont, mit jedem Serum auch die Go-Reaktionen angestellt. Haben wir nun z. B. an einem Tag 60 Seren von Go-Patienten und 140 andere Blutproben, so wird man immer wieder feststellen müssen, daß die negative Kontrolle oft einwandfrei gelöst hat, ein Drittel oder die Hälfte der anderen Seren aber noch eine deutliche Hemmung aufweisen, die einzelnen Seren lösen verschieden schnell. Das trifft selbstverständlich auch für die Go-Seren zu. Es handelt sich aber eben hier nicht um spezifisch positive Ausfälle, sondern genau wie bei den anderen Seren um noch nicht vollständige Lösung. Natürlich kommt auch der umgekehrte Fall vor, daß das vor 3 Tagen negative Serum, das heute als Kontrolle benutzt wird, eine leichte Hemmung aufweist. Es würde bei nur einer Kontrolle also die Gefahr bestehen, daß zu spät abgelesen wird. Das Compligon löst übrigens nicht so schnell nach wie das Behring- oder Labopharma-Antigen, alle drei brauchen aber eine längere Lösungszeit als die Wassermannsche Reaktion.

Zum Abschluß einige Worte über die Technik der Go-Reaktion. Während wir früher wie bei der WaR. mit einer festen Komplementverdünnung von 1 : 10 arbeiteten und den Ambozeptor auswerteten, bleiben wir jetzt bei einer konstanten Ambozeptorverdünnung und prüfen im Vorversuch die notwendige Verdünnung des Komplements. Zum Hauptversuch wird dann das 1,5fache der gerade noch lösenden Komplementmenge genommen. Wir sind früher bei kleineren Untersuchungszahlen oft auch mit einem 1 : 10 verdünnten Komplement ausgekommen, erreichen aber bei stärkerem Komplement bessere Ergebnisse, als wenn wir mit der Ambozeptormenge heraufgehen. Im übrigen wird das Komplement durch die Tatsache schlechter, daß bei 200 Seren, bei denen die WaR. und 3 verschiedene Go-Reaktionen angestellt werden, das Blut von sehr vielen Meerschweinchen benötigt wird, und je mehr Tiere hinzukommen, desto schlechter wird das Komplement. Wir setzen die Reaktionen manchmal mit bis 18proz. Komplement an, im Durchschnitt sind 15 Proz. erforderlich. Wichtig ist vielleicht der Hinweis, daß bei der Go-Reaktion, nicht wie bei der WaR. nach der 1stünd. Bindung im Brutschrank sofort das hämolytische System hinzugesetzt wird, sondern vorher noch ½—1 Std. bei Zimmertemperatur zugewartet wird. Das Wichtigste ist jedoch, den genauen Zeitpunkt des Ablesens nicht zu verpassen.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß das Compligon zwar den anderen geprüften Antigenen bedeutend überlegen ist, uns jedoch zur Zeit noch kein Antigen zur Verfügung steht, daß bei der Go. die gleichen Aufgaben erfüllt wie die Extrakte der WaR. bei Vorliegen einer Lues.

Aussprache.

A. Azzi und C. Fiorino (Turin):

Der Vortrag des Kollegen Krehnke hat uns besonders interessiert, weil wir uns lange mit dieser Frage beschäftigt haben.

Auch haben wir nach der klassischen Bordet-Wassermannschen Reaktion eine K.B.R. für Gonorrhoe ausgearbeitet, in der jedoch die einzelnen Elemente gewisse Varianten erfahren haben, welche die Reaktion empfindlicher, aber nicht komplizierter gestalten.

Für das Gelingen der Reaktion hat das Antigen die große Bedeutung. Wir verwendeten eine Suspension von Gonokokken in NaCl-Lösung, die wiederholt der Gefrier- und Auftautemperatur ausgesetzt worden war. Dieses wässerige Antigen hat ein schwaches antikomplementäres Vermögen und kann auch in relativ starken Konzentrationen verwendet werden, ohne daß aspezifische Resultate auftreten.

Eine beträchtliche Empfindlichkeit haben wir mit einer verdünnten Erythrozytenaufschwemmung (2—2,5 Proz.) und mit einem 1:20-Komplement eine gute Spezifizität mittels Bindungsphase im Eisschrank und Sensibilisierung der Erythrozyten mit 4—5 hämolytischen Einheiten und sofortiger Ablesung bei Auftreten der Hämolyse erhalten. Wir glauben, daß für die Prognose des Verlaufes einer Infektion der Vergleich wiederholt ausgeführter Reaktionen im Sinne der quantitativen Veränderungen der Resultate eine Bedeutung hat.

Die Technik des Go.K.B.R. haben wir auch für Diagnosen des Maltafiebers ausgearbeitet und haben Resultate erhalten, die zum Teil denen der Agglutination gleichwertig, zum Teil überlegen sind.

Kathe (Breslau):

Unsere Erfahrungen mit der Trockenblutprobe sprechen durchaus in dem günstigen Sinne, in dem von Herrn Dahr berichtet wurde; sie steht dem Verfahren von Kahn und der Citocholreaktion nicht nach. Ich halte sie auch für geeignet, im Laboratorium des Amtsarztes als Vorprobe — wohl verstanden: nicht als entscheidende Reaktion! — angewandt zu werden. Auf Wunsch der zuständigen Aufsichtsbehörden habe ich schon mehrfach Amtsärzte bzw. deren technische Assistentinnen in dreitägigen Lehrgängen in die Methode eingeführt.

Die im Gesundheitsamt ausgekämmten positiven Fälle werden dann im Med.-Untersuchungsamt nachgeprüft. Ich habe mich davon überzeugt, daß das Laboratorium des Amtsarztes dieser Aufgabe gerecht wird.

Die Reihenuntersuchungen auf Lues, wie sie Herr Dahr schon durchführt, werden allenthalben gefordert werden. Der Amtsarzt kann uns dann bei der Durchführung dieser Aufgabe wesentlich entlasten.

Clauberg (Berlin):

Es fällt auf, daß Dahr in mehr als 200000 Untersuchungen nur eine positive Ausbeute von 1,3 Proz. erzielte. Man ist unwillkürlich geneigt, diese Ziffern in Parallele zu setzen zu den vom Reichsgesundheitsamt durchgeführten statistischen Erhebungen zur Verbreitung der Geschlechtskrankheiten. Es sei daran erinnert, daß nach den vom Deutschen Hygiene-Museum für die hygienische Volksbelehrung herausgegebenen Diapositiven in Großstädten mehr als 40 Proz. der Männer über 40 Jahre und fast 20 Proz. der Frauen gleicher Altersgruppe als luetisch infiziert bezeichnet werden. Hier liegen offensichtlich Widersprüche vor, die einer Beseitigung bedürfen. Vielleicht klärt schon teilweise eine genügend weitgehende statistische Aufteilung des Dahrschen Materials (nach Geschlecht, Lebensalter, geographischen Bezirken usw.) die Sachlage. Unterstellt man, daß die Trockenprobe hinreichend scharf ist, so könnte man aus den mit ihr ermittelten Zahlenwerten schließen, daß die Selbstheilungstendenz der Lues wesentlich größer ist, als man gemeinhin annimmt.

R. Bieling (Marburg/Lahn).

H. Schmidt (Marburg/Lahn).

Peter Dahr (Köln) Schlußwort:

Die von Clauberg angeführten Zahlen über die Verbreitung der Lues erscheinen mir bei weitem zu hoch. Da es sich bei den von uns Untersuchten um arbeitsfähige Personen handelt, ist der von uns gefundene Hundertsatz der Verbreitung der Lues von 0,83 Proz. meines Erachtens nicht zu niedrig, und er entspricht durchaus den Erwartungen. Der Hundertsatz der seropositiven Lues in der Gesamtbevölkerung, also einschließlich der Kranken, Siechen, einschließlich der Prostituierten usw. ist selbstverständlich höher.

Es ist möglich, daß wir bei unseren Reihenuntersuchungen eine tatsächlich vorhandene Lues gelegentlich nicht erfassen. Auch die TBR ist keine hundertprozentig sichere Methode, wie das auch eine allein angewendete, noch so empfindliche Serumprobe nicht ist. Im übrigen kann sich die TBR an Zuverlässigkeit, also Reichbreite und Spezifität, mit den empfindlichsten Serumproben messen.

4. Tag: Donnerstag, den 30. März 1939.

Versammlungsleiter: Gildemeister (Berlin) und Kliewe (Gießen).

38. W. Bachmann und H. Mielke:

Ueber Virulenz und Toxingehalt von Stämmen pathogener und apathogener Herkunft des Bacterium proteus vulgare [1]).

In seiner Arbeit über „Pathogene und apathogene Proteusbakterien" (Diss. Kiel, Philos. Fak.; aus dem Hygienischen Institut der Universität Kiel) berichtete Günther über folgende Ergebnisse, die er an 30 Reinkulturen von B. proteus vulgare gewonnen hat, von denen 10 Stämme apathogener Herkunft waren (aus Nahrungsmitteln gezüchtet), 2 als alte Sammlungsstämme zur Verfügung standen — darunter eine Reinkultur von Proteus X 19 — und 18 Stämme aus menschlichen Krankheitsherden stammten:

1. Proteusstämme apathogener Herkunft waren vorwiegend Indolbildner im Gegensatz zu den Stämmen, die aus Krankheitsherden gezüchtet wurden.
2. Proteusstämme apathogener und pathogener Herkunft unterschieden sich fernerhin durch ihre auf Aszitesagar ungleiche Wachstumsintensität bei Züchtungstemperaturen von 37° C bzw. 20° C (Zimmertemperatur).
3. Proteusstämme pathogener Herkunft waren gegenüber Galle und Zephirol resistenter als die aus apathogenem Material gezüchteten Kulturen.
4. Schließlich zeigten Proteusstämme pathogener bzw. apathogener Herkunft im Mäuse- und Kaninchenversuch Unterschiede der Virulenz, und zwar mit höherer Toxizität der Proteusstämme, die aus Krankheitsherden gezüchtet waren.

Die Güntherschen Untersuchungen gaben im übrigen keine Antwort auf die Frage, ob die Giftwirkung der geprüften Proteusstämme auf ein Ektotoxin oder auf Leibesgifte zurückzuführen war, eine Fragestellung, die wir in vorliegender Arbeit an 12 Reinkulturen von B. proteus vulgare prüften, von denen 10 Stämme, und zwar 6 apathogener und 4 pathogener Herkunft, bereits bei den Untersuchungen Günthers Verwendung gefunden hatten und denen von uns 2 weitere Proteusstämme aus menschlichen Krankheitsherden (Stamm 35 und 39) hinzugefügt wurden. (Die Stämme 2, 3, 5, 6, 8 und 10 waren apathogener, die Stämme 13, 14, 15, 16, 35 und 39 pathogener Herkunft.)

Zuerst mit diesen Stämmen angestellte orientierende Virulenzprüfungen, bei denen weißen Mäusen 0,5 ccm einer Aufschwemmung bzw. einer Bouillonkultur lebender Proteusbakterien in verschiedener Konzentration ip. injiziert

---

1) Aus dem Hygienischen Institut der Universität Kiel (Direktor: Professor Dr. W. Bachmann).

wurde (ausgehend von 24stünd. Schrägagar- und Bouillonkulturen), führten in Uebereinstimmung mit den Güntherschen Untersuchungen wiederum zu dem Ergebnis (siehe Tabelle I), daß die aus Krankheitsherden isolierten Proteusstämme eine größere Virulenz zu besitzen scheinen als diejenigen pathogener Herkunft, eine Annahme, die, wie wir sehen werden, auch in der verschiedenen Ausbeute der Proteusstämme, insbesondere an Endotoxinen, eine weitere Stütze finden sollte (s. u.).

Tabelle I.

Ergebnis der Impfungen mit Vollkulturen.

Stamm	24 Std. Schrägagarkultur $1:1 = {}^1/_2$ Oese (1 Oese auf 1 ccm NaCl) je 1 Maus 0,5 ccm ip.			24 Std. Schrägagarkultur $1:10 = {}^1/_{20}$ Oese (1 Oese auf 10 ccm NaCl) je 2 Mäuse 0,5 ccm ip.		
	Impfung	Krankheit	gestorben nach	Impfung	Krankheit	gestorben nach
2	6. 1.	0	0	7. 2.	0	0
3	6. 1.	0	18 Std.	7. 2.	0	10 Tage 1 Maus
5	6. 1.	0	18 Std.	7. 2.	0	0
6	6. 1.	0	18 Std.	7. 2.	0	0
8	10. 1.	0	20 Std.	7. 2.	0	0
10	10. 1.	0	20 Std.	7. 2.	0	20 Std. 2 Mäuse
13	30. 11.	0	20 Std.	7. 2.	0	0
14	30. 11.	0	20 Std.	7. 2.	0	20 Std. 2 Mäuse
15	30. 11.	0	20 Std.	7. 2.	0	20 Std. 2 Mäuse
16	30. 11.	0	20 Std.	7. 2.	0	20 Std. 1 Maus
35	10. 1.	0	20 Std.	7. 2.	0	0
39	10. 1.	0	20 Std.	7. 2.	0	20 Std. 2 Mäuse
Stamm	24 Std. Bouillonkultur (unverdünnt) (4 Oesen auf 8 ccm Bouillon) je 1 Maus 0,5 ccm ip.			24 Std. Bouillonkultur (10fach verd.) (4 Oesen auf 8 ccm Bouillon) 0,5 ccm auf 10 ccm NaCl verdünnt davon je 2 Mäuse 0,5 ccm ip.		
	Impfung	Krankheit	gestorben nach	Impfung	Krankheit	gestorben nach
2	6. 1.	0	0	14. 2.	0	0
3	6. 1.	0	42 Std.	14. 2.	0	0
5	6. 1.	0	18 Std.	14. 2.	0	20 Std. 1 Maus
6	6. 1.	0	18 Std.	14. 2.	0	0
8	10. 1.	0	20 Std.	14. 2.	0	20 Std. 1 Maus
10	10. 1.	0	20 Std.	14. 2.	0	20 Std. 2 Mäuse
13	2. 12.	0	20 Std.	14. 2.	0	20 Std. 1 Maus 44 Std. 1 Maus
14	2. 12.	0	20 Std.	14. 2.	0	44 Std. 1 Maus
15	2. 12.	0	20 Std.	14. 2.	0	44 Std. 1 Maus
16	2. 12.	0	20 Std.	14. 2.	0	20 Std. 1 Maus 44 Std. 1 Maus
35	10. 1.	0	20 Std.	14. 2.	0	0
39	10. 1.	0	20 Std.	14. 2.	0	0

Zur Darstellung der fraglichen Ekto- und Endotoxine bei B. proteus vulgare bedienten wir uns der Methoden von Boivin und Mesrobeanu in der Modifikation nach Haas, die in der Folge kurz beschrieben werden soll:

1. Endotoxindarstellung: 20stünd. Agarkulturen auf Kolle-Schalen werden mit physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt und so lange zentrifugiert, bis sich ein fester Bodensatz von Bakterien gebildet hat. Nach dreimaligem Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung wird das Gewicht der feuchten Bakterienmasse bestimmt. Die Bakterien werden dann in so viel ccm destilliertem Wasser aufgenommen, daß 200 mg Bakterien 1 ccm Suspension entsprechen. Es gelang uns, durchschnittlich 5 g feuchte Bakterienmasse zu

isolieren, so daß wir 15 ccm Bakteriensuspension erhielten. Darauf wird die gleiche Menge n/2 Trichloressigsäure zugefügt und die Suspension für 3 Std. in den Eisschrank gestellt. Durch darauffolgendes Zentrifugieren werden die Bakterien abgetrennt und dann die überstehende Flussigkeit durch ein Seitz-Filter filtriert. Die Entfernung der Trichloressigsäure geschieht durch Dialyse in Zellophanschläuchen, und zwar wird zunachst 48 Std. gegen fließendes Wasser und dann 48 Std. gegen öfters gewechseltes destilliertes Wasser dialysiert. Die so dialysierten Extrakte (Endotoxine) wurden dann an der weißen Maus auf Giftwirkung geprüft.

Tabelle II.

Darstellung und Verimpfung von Endotoxinen und Ektotoxinen aus Stämmen apathogener Herkunft.

Stamm	Toxin	Hergestellt am	Impfungen	Krankheitserscheinungen	Gestorben nach	Gestorben am	Sektion	Ueberlebend
2	Endotoxin	9. 1. 39	9. 1. 1 Maus 0,5	0				+
			9. 1. 1 Maus 0,5	0				+
	Ektotoxin	31. 1. 39	3. 2. 1 Maus 0,5	0				+
			3. 2. 1 Maus 0,5	0				+
3	Endotoxin	16. 1. 39	16. 1. 1 Maus 0,5	0				+
			16. 1. 1 Maus 0,5	0				+
	Ektotoxin	31. 1. 39	4. 2. 1 Maus 0,5	0				+
			4. 2. 1 Maus 0,5	0				+
5	Endotoxin	12. 12. 38	12. 12. 1 Maus 0,5	0	24 Std.	13. 12.	o. B.	
			12. 12. 1 Maus 0,5	0				+
	Ektotoxin	13. 12. 38	13. 12. 1 Maus 0,5	0				+
			13. 12. 1 Maus 0,5	0				+
6	Endotoxin	23. 1. 38	23. 1. 1 Maus 0,5	0				+
			23. 1. 1 Maus 0,5	0				+
	Ektotoxin	21. 1. 38	Nach 13tägiger Bebrütung kein Ektotoxin gewonnen					
8	Endotoxin	30. 1. 39	30. 1. 1 Maus 0,5	0				+
			30. 1. 1 Maus 0,5	0				+
	Ektotoxin	21. 1. 39	Nach 13tägiger Bebrütung kein Ektotoxin gewonnen					
10	Endotoxin	28. 11. 38	28. 11. 1 Maus 0,5	0				+
			28. 11. 1 Maus 0,5	0				+
	Ektotoxin	13. 12. 38	Nach 13tägiger Bebrütung kein Ektotoxin gewonnen					

2. Ektotoxindarstellung: Bouillon (pH 8,0) wird mit Bakterien beimpft und 13 Tage bei 37° C bebrütet. Dann werden die Bakterien durch Filtration abgetrennt und das Bouillonkulturfiltrat mit n/2 Trichloressigsäure auf pH 3,5 eingestellt. Ein sich hierbei bildender weißlicher Niederschlag wird durch Zentrifugieren abgetrennt und im 10. Teil des Ausgangsvolumens n/100 Sodalösung aufgelöst.

Mit den so aus den einzelnen Proteusstämmen gewonnenen Endotoxinen bzw. Ektotoxinen wurden je zwei Mäuse mit 0,5 ccm ip. geimpft, und zwar mit folgenden — innerhalb eines Beobachtungszeitraumes von 4 Wochen festgestellten — Ergebnissen (Tabelle II).

Von den mit Endotoxin aus Proteusstämmen apathogener Herkunft (Stamm 2, 3, 5, 6, 8, 10) geimpften Mäusen starb nur ein Tier, und zwar 24 Std. nach Injektion des Endotoxins von Stamm 5; keine Krankheitserscheinungen, kein makroskopisch auffallender Sektionsbefund. Sämtliche übrigen Tiere blieben am Leben. Eine Ektotoxindarstellung gelang mit den Stämmen 6, 8 und 10 überhaupt nicht. Bei den übrigen Proteusstämmen apathogener Herkunft 2, 3 und 5 trat nach Zusatz von n/100 Trichloressigsäure ein schmutziggrauer Niederschlag auf, der je zwei Mäusen ip. injiziert wurde, die jedoch ohne Krankheitserscheinungen überlebten. Die Darstellung eines wirksamen Endo- oder Ektotoxins ist uns also mit den beschriebenen Verfahren aus Proteusstämmen apathogener Herkunft nicht gelungen.

Dagegen zeigten die aus Proteusstämmen pathogener Herkunft bereiteten Endo- bzw. Ektotoxine im Mäuseversuch folgende Wirkung (Tabelle III).

Stamm 13: Das fragliche Endotoxin führte bei einer Maus nach 20 Std. zum Tode. Die Sektion ergab keine krankhaften Veränderungen. Die andere Maus überlebte. Ein Ektotoxin konnte nicht hergestellt werden. Nach 13tägiger Bebrütung trat nach Zusatz von n/2 Trichloressigsäure kein Niederschlag auf.

Stamm 14: Die Endotoxininjektion tötete beide Mäuse nach 20 Std. Die Sektion ergab keinen krankhaften Befund. Anschließend wurden geringere Toxinmengen injiziert, und zwar 0,4, 0,3, 0,2 und 0,1 ccm des Bakterienextraktes. Es starb die Maus mit der Extraktdosis 0,3 nach 20 Std. Die übrigen Mäuse überlebten. Die Darstellung eines Ektotoxins gelang nicht.

Stamm 15: Das Endotoxin tötete beide Mäuse, eine nach 12 Std., die andere nach 7½ Tagen. Bei der Sektion wurden bei einer Maus flüssiger Darminhalt und Hämorrhagien in der Leber gefunden. Die Sektion der andern Maus ergab keinen krankhaften Befund. Die Injektion von Extraktverdünnungen (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) führte zu keinem eindeutigen Ergebnis. Es starben drei Tiere mit den geringeren Extraktkonzentrationen. Bei zwei Mäusen wurde Durchfall beobachtet. Bei dem Versuch der Ektotoxindarstellung entstand ein schmutziggrauer Niederschlag, der nach Vorschrift weiter verarbeitet wurde. Eine Maus starb 5½ Tage nach der Injektion; bei der Sektion fand sich flüssiger Darminhalt, sonst kein pathologischer Befund. Nach etwa 4 Wochen wurde die Ektotoxindarstellung wiederholt. Es entstand wiederum ein schmutziggrauer, flockiger Niederschlag, dessen Injektion von beiden Mäusen ohne nachfolgende Krankheitserscheinungen vertragen wurde.

Stamm 16: Die Endotoxininjektion führte bei beiden Mäusen nach 6½ und 6¾ Tagen zum Tode. Krankheitserscheinungen wurden nicht beobachtet. Bei der Sektion wurde bei einer Maus flüssiger Darminhalt festgestellt. Die Injektion geringerer Endotoxinmengen (0,4, 0,3, 0,2 und 0,1) führte bei der Extraktdosis 0,4 nach 24 Std. zum Tode. Die Maus hatte vorher durchfällige Stühle gehabt. Die übrigen Mäuse überlebten und zeigten keine Krank-

Tabelle III. Darstellung und Verimpfung von Endotoxinen

Stamm	Toxin	Hergestellt	Impfungen	Krankheitserscheinungen	Gestorben nach	Gestorben am	Sektion
13	Endotoxin	19. 12.	19. 12. 1 Maus 0,5	0	20 Std.	20. 12.	o. B.
			19. 12. 1 Maus 0,5	0			
	Ektotoxin	28. 12.	Nach 13tagiger Bebrutung kein Ektotoxin gewonnen! Kein Niederschlag!				
14	Endotoxin	5. 9.	21. 9. 1 Maus 0,5	0	20 Std.	22. 9.	o. B.
			21. 9. 1 Maus 0,5	0	20 Std.	22. 9.	o. B.
	Ektotoxin	6. 10.	Nach 5tagiger Bebrutung kein Ektotoxin gewonnen! Kein Niederschlag!				
		17. 10.	Nach 13tagiger Bebrutung kein Ektotoxin gewonnen! Kein Niederschlag!				
15	Endotoxin	16. 8.	16. 8. 1 Maus 0,5	0	12 Std.	16. 8.	Darminhalt flussig.
			16. 8. 1 Maus 0,5	0	$7^1/_2$ Tagen	23. 8.	Hamorrh. i. d. Leber
	Ektotoxin	20. 8.	20. 8. 1 Maus 0,5	0	$5^1/_2$ Tagen	26. 8.	Darminhalt flussig
			20. 8. 1 Maus 0,5	0			
		26. 9.	26. 9. 1 Maus 0,5	0			
			26. 9. 1 Maus 0,5	0			
16	Endotoxin	23. 8.	23. 8. 1 Maus 0,5	0	$6^1/_2$ Tagen	30. 8.	o. B.
			23. 8. 1 Maus 0,5	0	$6^3/_4$ Tagen	30. 8.	Darminhalt flussig
	Ektotoxin	5. 11.	Nach 2 Tg. (je 2 Mause 0,5 ccm)	0			
		7. 11.	„ 4 Tg. (je 2 Mause 0,5 ccm)				
		10. 11.	„ 7 Tg. (je 2 Mause 0,5 ccm)	0			
		12. 11.	„ 9 Tg. (je 2 Mause 0,5 ccm)	0			
		14. 11.	„ 11 Tg. (je 2 Mause 0,5 ccm)	0			
		16. 11.	„ 13 Tg. (je 2 Mause 0,5 ccm)	0			
35	Endotoxin	24. 10.	24. 10. 1 Maus 0,5	0	1 Tag	25. 10.	o. B.
			24. 10. 1 Maus 0,5	0	$1^1/_2$ Tagen	26. 10.	o. B.
			2. 12. 1 Maus 0,5	0	2 Tagen	4. 12.	o. B.
			2. 12. 1 Maus 0,5	0			
	Ektotoxin	21. 11.	21. 11. 1 Maus 0,5	0	13 Tagen	4. 12.	Bandwurm
			21. 11. 1 Maus 0,5	0			
39	Endotoxin	14. 11.	14. 11. 1 Maus 0,5	0	10 Tagen	24. 11.	o. B.
			14. 11. 1 Maus 0,5	0			
	Ektotoxin	6. 12.	Nach 13tagiger Bebrütung kein Ektotoxin gewonnen! Kein Niederschlag!				

und Ektotoxinen aus Stämmen pathogener Herkunft.

Ueberlebend	Toxin-Verdunnungen	Krankheits-erscheinungen	Gestorben		Sektion	Ueberlebend
			nach	am		
+						
	23. 9. 0,4	0				+
	0,3	0	20 Std.	24. 9.	o. B.	
	0,2	0				+
	0,1	0				+
	25. 8. 0,5	Durchfall				+
	1:10	0				+
	1:100	Durchfall	7 Tagen	1. 9.	o. B.	
	1:1000	0	6 Tagen	31. 9.	o. B.	
	1:10000	0	19 Tagen	13. 9.	o. B.	
+						
+						
+						
	1. 9. 0,4	Durchfall	24 Std.	2. 9.	gefüllte Blase	
	0,3	0				+
	0,2	0				+
	0,1	0				+
+						
+						
+						
+						
+						
+						
	26. 10. 0,4	0				+
	0,3	0				+
	0,2	0	1 Tag	27. 10.	o. B.	
	0,1	0				+
+						
+						
+						

heitserscheinungen. Die Ektotoxingewinnung wurde bei diesem Stamm auch nach verschieden langer Bebrütungsdauer (2, 4, 7, 9, 11 und 13 Tage) versucht. Jedesmal entstand nach Zusatz der n/2 Trichloressigsäure zum Bouillonkulturfiltrat ein schmutziggrauer, flockiger Niederschlag, der dann abgetrennt im 10. Teil des Ausgangsvolumens n/100 Sodalösung aufgelöst wurde; alle hiermit geimpften Mäuse überlebten ohne Krankheitserscheinungen.

Stamm 35: Das Endotoxin tötete beide Mäuse nach 1 und 1½ Tagen. Keine Krankheitserscheinungen, kein pathologischer Sektionsbefund. Die Injektion geringerer Toxinmengen (0,4, 0,3, 0,2 und 0,1 ccm) führte zu dem Ergebnis, daß die Maus mit der Extraktdosis 0,2 nach einem Tag starb, ohne einen pathologischen Sektionsbefund zu zeigen. Nach 39 Tagen wurde dasselbe Endotoxin nochmals in der Normaldosis zwei Mäusen injiziert. Eine Maus starb nach 2 Tagen, die andere überlebte. Wir nehmen an, daß das Endotoxin schon verändert war und infolgedessen seine volle Toxizität eingebüßt hatte. Bei der Ektotoxindarstellung erhielten wir wiederum den bereits erwähnten schmutziggrauen, flockigen Niederschlag. Eine Maus starb 13 Tage post injectionem. Sektionsbefund: Bandwurm. Die andere Maus überlebte.

Stamm 39: Das Endotoxin tötete eine Maus nach 10 Tagen. Sektionsbefund: o. B. Die andere Maus überlebte und zeigte keine Krankheitserscheinungen. Die Darstellung des Ektotoxins gelang nicht; es trat kein Niederschlag auf.

Zusammenfassung.

Mit der durch Haas modifizierten Methode von Boivin und Mesrobeanu ist es uns nicht gelungen, aus je 6 Proteusstämmen pathogener bzw. apathogener Herkunft ein wirksames Ektotoxin herzustellen. In 6 Fällen trat nach Zusatz von n/2 Trichloressigsäure überhaupt kein Niederschlag auf; bei den anderen 6 Stämmen konnte zwar aus dem Bouillonfiltrat ein schmutziggrauer, flockiger Niederschlag gewonnen werden, der aber bei den damit ip. geimpften Mäusen weder Krankheitssymptome noch Exitus herbeiführte.

Aus den untersuchten 6 Proteusstämmen pathogener Herkunft gelang es dagegen, mit der beschriebenen Methode ein wirksames Endotoxin zu bereiten, das Mäuse nach ip. Injektion in einer Zeit von 20 Std. bis zu 10 Tagen zu töten vermochte. Bei 6 Proteusstämmen apathogener Herkunft war es jedoch nicht möglich, ein derartiges Endotoxin zu gewinnen, bzw. es im Mäuseversuch als wirksam nachzuweisen.

Auf Grund dieser Untersuchungsergebnisse sind wir der Ansicht, daß das Bacterium proteus vulgare nicht im engeren Sinne zu den Ektotoxinbildnern gerechnet werden darf, und daß vermutlich auch die beim Menschen hin und wieder auftretenden Proteus-Intoxikationen ebenfalls nicht als Ektotoxinvergiftungen aufzufassen sind.

Schrifttum.

Haas, R., Z. Immun.forschg **91**, 254 (1937); **92**, 355 (1938); **94**, 239 (1938). — Boivin, A., u. Mesrobeanu, L. Revue d'Immun. **1**, No 6, 533 (1935).

Bürgers (Königsberg)
fragt den Vortragenden, ob die Wirkung der Toxine auch durch Verfütterung an Mäusen geprüft wurde. Bei solchen Versuchen ergab sich nämlich im Königsberger Institut keine Giftwirkung bei Proteus, während eine solche bei bestimmten Colirassen leicht nachweisbar war.

39. M. Dreguss (Budapest)[1]):

Untersuchungen in Ungarn über das Influenzavirus [2]).

In dem Staatlichen Hygienischen Institut in Budapest (Direktor: Prof. Tomcsik) konnten wir — Dr. R. M. Taylor und ich selbst — 1937 fünf Influenzavirusstämme, und dieses Jahr wieder mehr als zehn Stämme isolieren (Passagen mit unserem diesjährigen Material sind noch im Gange; so wissen wir nicht, wie groß die endgültige Zahl unserer diesjährigen Virusstämme sein wird). Alle diese Stämme zeigen die klassischen Eigenschaften des humanen Influenzavirus: sie alle kommen von Influenzapatienten, sie sind durch Gradocolmembranen einwandfrei filtrierbar, sie sind tierpathogen für Frettchen und weiße Mäuse, sie sind züchtbar in Gewebekultur (Hühnerembryobrei), und man kann sie mit spezifischen Immunsera neutralisieren.

Ich möchte besonders hervorheben, daß wir beide Gruppen unserer Virusstämme während Grippeepidemien in Ungarn am Anfang 1937 und 1939 isolierten. Dagegen konnten wir im Jahre 1938 aus angeblichen Influenzafällen keinen einzigen Influenzavirusstamm isolieren. Tatsächlich herrschte in Ungarn im Jahre 1938 keine Grippeepidemie. Immunologisch sind die ungarischen Stämme von 1937 untereinander fast identisch. Dagegen zeigen diese Stämme gegenüber dem englischen Standardstamm WS, sowie dem amerikanischen Stamm PR8 ausgesprochene Antigendifferenzen; jedoch fallen alle drei Gruppen (ungarisch, englisch und amerikanisch) in die Kategorie des humanen Influenzavirus.

Unsere Ergebnisse, welche wir in 2½ Jahren an 342 Frettchen und mehr als 40000 Mäusen erhalten haben, sprechen eindeutig dafür, daß dem Influenzavirus in der wahren epidemischen Influenza unbedingt eine ätiologische Bedeutung zugeschrieben werden muß. Unsere negativen Resultate, die mit den epidemiologischen Daten parallel laufen, können als Kontrolle betrachtet werden. Auf diese Weise schaltet sich das etwaige Vorhandensein dieses Virus ursprünglich in den Versuchstieren selbst natürlich aus.

Sammelbericht VII: August Rippel (Göttingen):

Das Wasser als Standort der Mikroorganismen [3]).

An zwei Standorten spielt sich in der Natur alljährlich der organische Kreislauf der Stoffe ab: im Boden und im Wasser. Er vollzieht sich in der durch die bekannte Formel

$$6\,CO_2 + 6\,H_2O \rightleftarrows (HCHO)_6 + 6\,O_2$$

1) Aus dem Staatl. Ungarischen Hygiene-Institut Budapest (Direktor: Prof. Dr. J. Tomcsik).
2) Die Ergebnisse werden an anderer Stelle ausführlich veröffentlicht.
3) Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen (Direktor: Prof. Dr. A. Rippel).

gekennzeichneten Weise. Diese läßt einerseits (von links nach rechts) den Aufbau der organischen Stoffe durch die autotrophen grünen Pflanzen in der photosynthetischen Assimilation der Kohlensäure erkennen, andererseits (von rechts nach links) den durch die chlorophyllosen heterotrophen Mikroorganismen durchgeführten Abbau, die Mineralisation, wobei wieder das Ausgangsmaterial für die Synthese hergestellt wird. Die Ausnahmen auf seiten der Mikroorganismen — Photosynthese durch Purpurbakterien und grüne Bakterien, Chemosynthese durch Ammoniak-oxydierende, Schwefelwasserstoff-oxydierende und andere Bakterien — spielen in dieser Bilanz, im ganzen gesehen, keine Rolle. Sinngemäß werden sich in diesen Auf- bzw. Abbau die übrigen Nährstoffe (N, P, S, K usw.) einordnen.

Die Formel zeigt weiterhin die für die Tätigkeit der heterotrophen Mikroorganismen grundlegende Tatsache, daß der Sauerstoff das bewegende Moment für die Möglichkeit der vollständig verlaufenden Mineralisation darstellt. Jedes Molekül Sauerstoff, das hierbei ausfällt, läßt die Mineralisation unvollständig werden, unterbricht also den Kreislauf der Stoffe.

Boden und Wasser scheinen biologische Gegensätze zu sein; die naive Anschauung hat sie ja auch als verschiedene Elemente einander gegenübergestellt. Die mikrobiologische Erkenntnis zeigt indessen, daß dies nicht in dem Umfang der Fall ist, wie man vermuten könnte. Ein kurzer Vergleich beider Standorte wird das für das Wasser als Standort Wesentliche erkennen lassen. Es sei vorweg bemerkt, daß im Kreislauf der Stoffe die Vorgänge im Wasser lediglich zeitlich oder örtlich auseinandergezogen erscheinen, die im Boden in größerer Geschlossenheit verlaufen. Es kommt dabei allerdings in gewissen Fälle zum Auftreten oder Ausfallen bestimmter Formen oder Stoffwechselvorgänge im Wasser, wie noch zu zeigen sein wird. Hier sei nur bemerkt, daß das Wasser, in dem im Vergleich zum Boden die Pilze stark zurücktreten bzw. auf niedere Formen beschränkt sind, der Standort der besonders gut beweglichen Formen (Vibrio und Spirillum) ist, ferner von Protozoen; die bodenbewohnenden Protozoen unterscheiden sich von den aquatischen Formen durch ihre sehr viel geringere Größe; sowie das starke Zurücktreten bis fast völlige Fehlen der Ziliaten. Offensichtlich spielen die Bodenprotozoen nicht die Rolle als Bakterienvertilger wie die Wasserprotozoen (1).

Ueber die zahlenmäßige Verteilung der Bakterien im Wasser unterrichtet zunächst folgende Uebersicht nach Klein und Steiner (2); es fanden sich im Lunzer Untersee (österreichische Kalkalpen, Gau Oberdonau) folgende Keimgehalte je 1 ccm:

Wasser		Bodenschlamm	
Tiefe in m	Zahl	Tiefe in cm	Zahl
0	50	1,6	45 500
1	0	4,0	215 000
15	90	6,4	400 000
33	80	8,4	320 000

Es zeigt sich also, wie das auch in anderen Süßwasserseen und im Meere gefunden wurde, daß die Bakterien im Wasser nur in sehr geringer Zahl vorkommen, ihr eigentlicher Standort aber der Bodenschlamm ist. Nur bei Verschmutzung des Wassers durch organische Stoffe steigt der Keimgehalt bis zu der in Abwässern beobachteten Höhe von Millionen je 1 ccm. Im Boden ist nun die Verteilung genau die gleiche: Versuche russischer Forscher haben

gezeigt, daß das die festen Bodenteilchen umhüllende bzw. als Kapillarwasser zwischen ihnen befindliche Wasser verhältnismäßig keimarm ist, die Mikroorganismen unmittelbar an den festen Bodenbestandteilen sitzen, und erst Zufuhr organischer Stoffe den Mikroorganismengehalt des Bodenwassers emporschnellen läßt (3).

Die festen, vornehmlich die kolloidalen Bestandteile des Bodens und ebenso die des Bodenschlamms in Gewässern wirken auf Mikroorganismen stark adsorptiv. Dabei werden die verschiedenen Mikroorganismen von den jeweiligen kolloidalen Stoffen verschieden stark adsorbiert, ferner kann Adsorptionsaustausch der verschiedenen Mikroorganismen erfolgen, und endlich werden die verschiedenen biochemischen Umsetzungen durch die Adsorption verschieden beeinflußt (3).

Abgesehen von diesen Adsorptionserscheinungen ist die Beschränkung der Mikroorganismen auf die unmittelbare Umgebung der festen Bestandteile schon deshalb verständlich, weil die leicht löslichen organischen Stoffe in der wässerigen Phase schnell abgebaut sind, die schwer löslichen der Humusstoffe bzw. des Bodenschlamms demnach als langsam fließende Quelle übrig bleiben. Eine praktisch wichtige Folge davon ist jedenfalls, daß das ausfließende Quellwasser normalerweise sehr keimarm, praktisch so gut wie keimfrei, ist und die Keimarmut nicht verunreinigter Gewässer durch die adsorbierende Wirkung des Bodenschlamms aufrechterhalten bleibt.

Für die Verhältnisse im Wasser ist noch von besonderer Wichtigkeit, daß auch die Wasserpflanzen usw., soweit es ihre Größe zuläßt, auf ihrer Oberfläche eine epiphytische, oder (wie man sie in Hinblick auf die besonderen Verhältnisse genannt hat) „periphytische“ Mikroorganismenflora beherbergen; so hat man z. B. häufig Azobacter gefunden, was für den Stickstoffhaushalt der Gewässer von Bedeutung ist, wie noch zu sagen sein wird (3).

Eine für die Praxis der Wasseruntersuchung wichtige Beobachtung ist hier noch zu erwähnen: Es hat sich bei Untersuchungen amerikanischer Autoren gezeigt, daß Aufbewahrung von Seewasser in kleinen Gläsern zu höheren Mikroorganismenzahlen führte als Aufbewahrung in großen Gläsern. Die in jenen relativ größere Oberfläche begünstigte eben die Entwicklung der Mikroorganismen (3).

Auf der Tatsache der Kolloidoberflächen als Träger der Mikroorganismenwelt im Wasser beruht ja auch die Wirkung des „Belebtschlamm-Verfahrens“ der Abwässerreinigung. Auch darauf soll hier noch hingewiesen werden, daß Kolloide insofern noch günstig auf das Mikroorganismenleben wirken, als sie namentlich eine günstige Verteilung der unlöslichen Eisenverbindungen gewährleisten (3).

Wir wenden uns nunmehr zur Besprechung der einzelnen, für das Leben der Mikroorganismen entscheidenden Faktoren, nachdem die Bedeutung der organischen Substanz oben schon erwähnt wurde. Zunächst das Licht. Es spielt im Boden zweifellos keine besondere Rolle, da die wirksamen Strahlen des sichtbaren Spektrums schon von dünnen Bodenschichten absorbiert werden. Trotzdem finden sich — bis zu mehreren 100000 je 1 g — grüne Algen im Boden, selbst noch in tieferen Schichten, bis herunter zu 1 m Tiefe. Ob die von Fehér vertretene Ansicht, daß von ihnen ultrarote Strahlen zur Assimilation herangezogen werden können, richtig ist, kann zweifelhaft sein, zumal sie später vom Verf. selbst aufgegeben wurde, allerdings zugunsten der Wirksamkeit noch unbekannter Strahlen (4).

Ganz anders liegen die Verhältnisse im Wasser: Hier kann das Licht verhältnismäßig ungehindert eindringen, so daß eine Kohlensäureassimilation durch grüne Pflanzen (einschließlich der Algen) möglich ist. Die Auswirkung

der dabei stattfindenden Sauerstoffbildung für das Mikroorganismenleben wird noch zu erwähnen sein, ebenso die Wirkung des Lichtes auf die Stickstoffbindung. Hier interessiert vor allem die Tatsache, daß die Lichtstrahlen gewissen Bakterien eine Photosynthese ermöglichen. Es handelt sich um Purpurbakterien (Rhodaceen) und grüne Bakterien, die durch ihre, teilweise dem Chlorophyll sehr nahe stehenden, Farbstoffe die Verarbeitung der Kohlensäure durchzuführen vermögen. Allerdings zeigt sich dieser Vorgang, der Umgebung entsprechend, abgewandelt. Die Thiorhodaceen oxydieren unter vollständigem Sauerstoffmangel Schwefelwasserstoff zur Schwefelsäure, unter gleichzeitiger Reduktion der Kohlensäure, wobei also Schwefelwasserstoff als Wasserstoffdonator für die Reduktion der Kohlensäure, diese als Sauerstoffdonator für die Schwefelwasserstoffoxydation (neben entsprechender Wirkung der Bestandteile des Wassers) erscheinen:

$$SH_2 + 2\,H_2O + 2\,CO_2 = 2\,(HCHO) + H_2SO_4$$

Dieser Vorgang ist allerdings nur mit Hilfe der Lichtenergie möglich, wobei auch ultrarote Strahlen verwendet werden können. Auch elementarer Wasserstoff kann an Stelle des Schwefelwasserstoffs verarbeitet werden. Die Athiorhodaceen, die also keine Beziehung zum Sauerstoff zeigen, verwenden in der gleichen Weise organische Stoffe als Wasserstoffdonatoren zur Reduktion der Kohlensäure, wobei sie selbst oxydiert werden, unter Umständen bis zur Kohlensäure (5).

Beachtenswert sind noch Wirkungen des Lichtes, insbesondere der kurzwelligen, so auch der ultravioletten, Strahlen auf die Bildung von Farbstoffen bei Mikroorganismen, die in keiner Beziehung zu photosynthetischer Fähigkeit stehen. Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, daß diese Strahlen die Bildung von Farbstoffen bei gewissen Mikroorganismen befördern oder sogar erst auslösen. So wird man auch beim Herstellen von Plattenkulturen aus Erde nur wenig farbstoffbildende Bakterien feststellen können, sehr viele dagegen bei Platten aus Wasser (oder auch von Luft, von Stroh u. dgl.) (6). Auf die abtötende Wirkung ultravioletter Strahlen sei hier nicht eingegangen.

Ein weiterer Faktor ist der Sauerstoff. Im Vergleich zum Boden ist das Wasser da, wo es sich um stagnierendes Wasser, insbesondere also solches von größerer Tiefe, handelt, meist schlechter mit Sauerstoff versorgt. Im Boden ist normalerweise die Tiefe der Wasserschicht gering, wenn wir von den anomalen bzw. vorübergehenden Fällen voller Wassersättigung absehen. Deshalb wird es in ihm nicht leicht zu einem erheblichen oder lange anhaltenden Sauerstoffmangel kommen können, zumal die Absorptionsfähigkeit der Bodenkolloide sich auch auf Gase, wie den Sauerstoff, erstreckt.

Man könnte vermuten, daß im Wasser die Sauerstoffversorgung besonders günstig liegen müßte, da ja durch die photosynthetische Tätigkeit der grünen Pflanzen (einschließlich der Algen) Sauerstoff in das Wasser gelangt. Aber abgesehen davon, daß z. B. in der Nacht auch die grünen Pflanzen nicht nur keinen Sauerstoff liefern, sondern ihn auch verbrauchen, reicht offenbar die Diffusion von der Atmosphäre her nicht aus, den verbrauchten Sauerstoff in stehenden Gewässern von bestimmter Tiefe genügend zu ergänzen. Das ist weiterhin, auch in fließenden Gewässern, dann der Fall, wenn starke Verschmutzung des Wassers mit organischen Stoffen den Sauerstoffverbrauch zu stark belastet (Bedingungen in Abwässern organischer Herkunft). So ist die Folge eine Bildung und Anhäufung unvollkommen oxydierter bzw. reduzierter Stoffe, unter denen der Schwefelwasserstoff am charakteristischsten ist. Wo eine Oxydation dieses Schwefelwasserstoffs, sei es photochemisch, wie oben ausgeführt, oder (bei Vorhandensein von Sauerstoff) durch die zahlreich vor-

kommenden farblosen Schwefelbakterien nicht möglich ist, zeigt sich infolgedessen eine starke Anhäufung. Das beste Beispiel bietet das Schwarze Meer (7), dessen Verbindung mit dem Mittelmeer nur eine etwa 50 m tiefe Schwelle in Dardanellen und Bosporus bildet, die einen Ausgleich in den tieferen Schichten verhindert:

Schwefelwasserstoffgehalt des Schwarzen Meeres, ccm SH_2 je Liter

Tiefe in m	ccm SH_2
213	0,33
427	2,22
2026	5,55
2528	6,55

Dieser Schwefelwasserstoffgehalt des Schwarzen Meeres ist denn auch die Ursache dafür, daß der Aal im Donaugebiet nicht einheimisch ist, da er bei seiner Aufwärtswanderung aus dem Meer in die Flüsse die Schwefelwasserstoffschicht nicht durchdringen kann.

Die Bildung dieser Schwefelwasserstoffmengen erfolgt durch Desulfurikation bei Sauerstoffmangel, wobei der gebundene Sauerstoff der im Wasser gelösten Sulfate organische Stoffe oxydiert und dabei eben zu Schwefelwasserstoff reduziert wird. Auf diese Weise entsteht auch der Schwefelwasserstoff im Oelwasser ölführender Schichten. Die Bildung und Anhäufung von Schwefelwasserstoff durch anaerobe Zersetzung schwefelhaltiger Eiweiß- oder sonstiger organischer Stoffe dürfte in der Natur der Desulfurikation gegenüber quantitativ keine große Rolle spielen. Bei Gegenwart von Eisen fällt schwarzes Schwefeleisen (Eisensulfid) aus; der schwarze Schwefeleisenschlamm ist für die Meerestiefen und sonstige Gewässer mit geeigneten Bedingungen (z. B. der Limanschlamm der russisch-asiatischen Salzseen) charakteristisch. Auch in unseren Teichen und Flüssen können wir beim Herausziehen von Wasserpflanzen im Schlamm dieses schwarze Schwefeleisen feststellen. Die Ablagerungen von Schwefelkies in geologischen Zeiten, die vielfach besonders charakteristisch noch bei Versteinerungen erscheinen, haben sich auf gleiche Weise vollzogen, ebenso sicherlich auch die Ausfällungen von Kupfersulfid, beim Vorhandensein von Kupfer, ein Vorgang, der zur Entstehung des Mansfelder Kupferschiefers führte (8).

Niemals kommt es normalerweise im Erdboden zu einer Desulfurikation oder Anhäufung von Schwefelwasserstoff aus sonstigem Wege. Infolge seiner guten Durchlüftung wird hier etwa beim Abbau von schwefelhaltigen Eiweißstoffen die Schwefelwasserstoffstufe, die an sich durchlaufen werden muß, sofort oxydiert. So enthält also das Quellwasser keinen Schwefelwasserstoff oder sonstige reduzierten Stoffe. Nur im (stagnierenden) Grundwasser kann die schlechte Durchlüftung zur Anhäufung reduzierter Stoffe (Schwefelwasserstoff, Ferro-Verbindungen, Nitrit, Ammoniak) führen, die künstlich durch die bekannten Methoden entfernt werden, falls das Wasser zu Trinkzwecken dienen soll.

Für den Mikrobiologen ist dieser Vorgang noch insofern von besonderem Interesse, als Starkey nachgewiesen hat, daß der die Desulfurikation durchführende Organismus (Vibrio bzw. Spirillum desulfuricans) bei hoher Temperatur, 55° C (nicht bei niederer, 30° C) Sporen bildet, ein für diese Mikroorganismengruppe eigenartiger Fall. Für den Organismus wurde infolgedessen die neue Gattung Sporovibrio geschaffen (9).

Eine Parallele zum Schwefelumsatz bietet der Kreislauf des Stickstoffs, der als Nährstoff für die Organismen in der Natur eine besonders große Rolle spielt. Der Abbau der organischen Stickstoffverbindungen führt

im Erdboden bei stärker saurer Reaktion zum Ammoniak, im annähernd neutralen oder schwach sauren Boden schließt sich sofort Nitratbildung an, ohne daß es zur Anhäufung wesentlicher Mengen von Ammoniak kommt, während die Zwischenstufe der Oxydation, Nitrit, überhaupt nicht auftritt, obwohl die Nitritbildung aus Ammoniak durch andere Bakterien erfolgt als die Nitratbildung aus Nitrit. Im Wasser erfolgt im allgemeinen keine Nitratbildung aus Ammoniak; dagegen findet sich, namentlich in mit organischen Stoffen verunreinigtem Wasser, Nitrit, das hier aber durch Reduktion der in das Wasser aus dem Boden geschwemmten Nitrate entsteht. Im Boden findet auch normalerweise keine Denitrifikation statt (Zerstörung von Nitraten unter Bildung von elementarem Stickstoff bei Sauerstoffmangel, unter Oxydation organischer Stoffe durch den Sauerstoff der Nitrate, analog dem Vorgang der Desulfurikation, wobei aber andere Bakterien beteiligt sind, z. B. Pseudomonas fluorescens, pyocyaneus und zahlreiche andere). In Abwässern dagegen, in denen Gegenwart organischer Stoffe starken Sauerstoffschwund verursacht, erfolgt auch kräftige Denitrifikation.

Im Kreislauf des Stickstoffs ist vor allem, namentlich in Hinblick auf die Verhältnisse im Wasser, die Bindung des elementaren Luftstickstoffs bedeutsam. Sie spielt im Boden, wenn wir von der Leguminosen-Symbiose mit Knöllchenbakterien und der Erlen-Symbiose absehen, nur eine untergeordnete Rolle. Der Grund dafür ist der, daß den frei im Erdboden lebenden stickstoffbindenden Bakterien (Azotobacter und Bacillus amylobacter) nicht genügend Energiematerial (assimilierbare Kohlenstoffverbindungen) zur Verfügung steht. Im Wasser liegen die Verhältnisse weitaus günstiger. Das Licht ermöglichst hier ausgiebige Photosynthese durch Algen usw., mit denen Azobacter in Gemeinschaft leben und Stickstoff binden kann, wie folgendes Beispiel nach Schröder zeigt:

Chlorella allein	0,24 mg N je 100 ccm gebunden
Azotobacter + Chlorella	3,88 mg N „ „ „ „

Dabei bezieht Azotobacter von den Algen die für die Stickstoffbindung notwendigen Kohlenstoffverbindungen, die Algen erhalten von Azotobacter den elementaren Stickstoff in gebundener Form, die sie verwerten können. Es ist verschiedentlich nachgewiesen, daß diese beiden Gruppen von Mikroorganismen die entsprechenden Verbindungen ausscheiden (10). Die praktische Folge davon ist, daß der Stickstoffhaushalt im Wasser — im Gegensatz zu den Verhältnissen im Boden — weitgehend (d. h. soweit es die Belichtung zuläßt), ohne künstliche Düngung mit gebundenem Stickstoff aufrechterhalten werden kann, z. B. in der Teichwirtschaft, wo Düngung mit kohlensaurem Kalk, Phosphorsäure und Kalium genügen (11).

Bei der Phosphorsäure finden wir entgegengesetztes Verhalten: Sie ist im Boden unbeweglich infolge Ausfällung als Eisen- oder Kalziumphosphat. Versuche mit Azotobacter, der ein biologisches Reagens auf Phosphorsäure ist, zeigten auch, daß sich die Phosphorsäure kaum vom Ort ihrer Einbringung entfernt (12). Daraus geht schon hervor, daß die Phosphorsäure im Wasser nur in geringem Maße in die Wasserschichten selbst eindringt und der Schlamm den Ort der Regeneration darstellt, daneben natürlich auch die im Plankton und den sonstigen Wasserbewohnern festgelegte Phosphorsäure. Tatsächlich hat sich gezeigt, daß die Bildung lebender Masse im Wasser weitgehend eine Funktion der Phosphorsäure ist, die hier also als begrenzender Faktor des Organismenlebens auftritt (13). Auf die Verschiedenheiten im einzelnen, namentlich im Meere, kann hier natürlich nicht eingegangen werden.

Von sonstigen besonderen Verhältnissen im Wasser seien noch Ausfällungen organischer Stoffe erwähnt. Kalk, genauer kohlensaurer Kalk, wird im Süßwasser vornehmlich durch die Tätigkeit von Algen und anderen grünen Wasserpflanzen ausgefällt, die aus dem im Wasser gelösten Kalziumbikarbonat die Kohlensäure assimilieren, wobei $CaCO_3$ ausfällt. Im Meer wird durch die Tätigkeit zahlreicher, nichtspezifischer Bakterien kohlensaurer Kalk durch eine ganze Reihe von Stoffwechselvorgängen ausgefällt, wie durch Desulfurikation von Kalziumsulfat, Verarbeitung organischer Kalziumverbindungen, Alkalisieren des Mediums bei der Denitrifikation, Ammoniakbildung usw. Dieser Vorgang führte in geologischen Zeiten zur Entstehung ungeschichteter Kalksteine und vollzieht sich noch heute in der tropischen Flachsee, z. B. in der Bahama-Bank, wie Bavendamm zeigte (14).

Reduzierte (2wertige) Eisen- und Manganverbindungen, die in Wasser verhältnismäßig leicht löslich und bei Sauerstoffmangel vorhanden sind, werden bei Gegenwart von Sauerstoff von Eisenbakterien zur 3wertigen (von der Ferro- bzw. Mangano- zur Ferri- bzw. Mangani-Stufe) oxydiert und fallen infolge ihrer schwereren Löslichkeit aus. Entstehung von Raseneisenerz und Ablagerung von Eisen- bzw. Manganhydroxyd in eisenhaltigen Quellen, in Wasserleitungsrohren usw. sind der sichtbare Ausdruck derartiger Vorgänge. Bei Nichtoxydation kann, wie oben erwähnt, der schwarze Schwefeleisenschlamm zur Ablagerung kommen (15).

Die sonstigen, das Leben der Mikroorganismen beeinflussenden Faktoren (Temperatur, Reaktion, andere als die oben erwähnten Nährstoffe usw.) spielen selbstverständlich ebenfalls eine wichtige Rolle. Es sind mir aber keine Vorgänge bekannt, in denen sie im Wasser als Standort eine besondere Bedeutung besäßen, die über ihre allgemeine Bedeutung hinausgeht. Es kann aber doch noch darauf hingewiesen werden, daß im Boden gewisse Spurenelemente, die für das Leben der Mikroorganismen und zum Teil auch der höheren Organismen wichtig sind, wie Kupfer und Molybdän, trotz der geringen wirksamen Menge doch in gewissen Böden fehlen und so als begrenzende Faktoren der Entwicklung von niederen und höheren Organismen auftreten können (16). Es ist durchaus möglich, daß auch im Wasser derartige Auswirkungen vorhanden sein können. Hinsichtlich des Eisens hatte Uspenski die Meinung ausgesprochen, daß die Verbreitung der Algen im Wasser insbesondere durch die Menge des verwertbaren Eisens bedingt sei, welche Vorstellung aber augenscheinlich zu weit und allgemein gefaßt war (17). Trotzdem dürfte es geboten erscheinen, solchen Dingen weiter nachzugehen.

Fassen wir zusammen, indem wir insbesondere einen Rückblick werfen auf die praktische Bedeutung des Mikroorganismenlebens im Wasser, so ergibt sich folgendes: Der allgemeine Stoffkreislauf in der Natur, eine in ihrer Gesamtheit und in ihren Teilvorgängen biologisch höchst fesselnde und für die Vorgänge in der Natur notwendige Erscheinung, bildet die Grundlage der menschlichen Ernährung, da ohne die von den Mikroorganismen durchgeführte Mineralisation keine Erzeugung von Pflanzemmasse möglich wäre. Z. B. würde die Festlegung der Kohlensäure in der Pflanzensubstanz ohne die Regeneration durch die Mikroorganismentätigkeit, jährlich gleich bleibende Stärke vorausgesetzt, bereits in 30—40 Jahren zu einem völligen Schwund der aufnehmbaren Kohlensäure auf der Erde führen (18). Die Landwirtschaft ist der Zweig der menschlichen Tätigkeit, der sich mit der Nutzbarmachung dieser Mineralisationsvorgänge zur Sicherung der menschlichen Ernährung befaßt.

Von speziellen Vorgängen im Rahmen dieses allgemeinen Stoffkreislaufes erwähnen wir die Teichwirtschaft, die Erzeugung von Fischmasse im

Binnenland, die wachsende praktische Bedeutung gewinnt, und deren Besonderheit oben erwähnt wurde. Nicht vergessen werden darf die Seewirtschaft. Es ist kein Zufall, daß unsere Walflotte stets einen Stab von Biologen mit sich führt zur Erforschung der Nahrungsverhältnisse der Wale, die ja mittelbar oder unmittelbar mit dem Mikroorganismenleben zusammenhängen. Sie wird uns die bestmögliche Ausnutzung der Fanggründe aufzeigen und schädigende Eingriffe zu vermeiden lehren.

Die immer mehr steigende Verschmutzung unserer Gewässer zwingt zu Maßnahmen, ihre biologische Reinigung zu beschleunigen bzw. die Reinigung schon durchzuführen, bevor die verunreinigenden Stoffe in das Wasser gelangen. Zwei Gesichtspunkte müssen hier maßgebend sein: Es müssen nach Möglichkeit die in den Abfallstoffen vorhandenen wertvollen Nährstoffe wieder für die menschliche Ernährung zurückgewonnen werden, also auf dem Wege über die landwirtschaftliche Verwertung. Und ferner stellt die Abwasserfrage ein Problem dar, das für die Hygiene von einer Bedeutung ist, die in diesem Kreise nicht besonders hervorgehoben zu werden braucht.

Schrifttum.

Vorbemerkung: Da die vorliegende Darstellung sich auf eine Fülle von Einzeltatsachen stützt, ist es nicht möglich, die Literatur erschöpfend anzuführen. Es sei infolgedessen auf die Zusammenstellung neuerer Literatur bei A. Rippel, Handbuch der Bodenlehre, hrsg. von E. Blanck, Ergänzungsband, Berlin, J. Springer, 1939, verwiesen. Nur Einzelliteratur sowie dort nicht erwähnte Literatur ist im folgenden besonders zitiert.

1) Rippel, A., S. 466ff. — 2) Klein, G., u. Steiner, M., Oesterr. bot. Z. **78**, 289 (1929). — 3) Rippel, A., S. 471 ff. — 4) Fehér, D., u. Frank, M., Arch. f. Mikrobiol. **7**, 1 (1938); ebenda **10**, H. 2 (1939) (im Erscheinen). — 5) Rippel, A., S. 577 f,. — 6) Rippel, A., S. 573. — 7) Lebedinzeff, Trav. Soc. natural Odessa (russ.) **16** (1891); zitiert nach Lafar, Handbuch d. techn. Mykologie 2. Aufl., Bd. 3, 222. — 8) Rippel, A., S. 575. — 9) Starkey, R. L., Arch. f. Mikrobiol. **9**, 268 (1938). — 10) Rippel, A., S. 552 f. — 11) Fischer, Herm., Naturwissenschaftliche Grundlagen des Pflanzenbaus und der Teichwirtschaft usw. Stuttgart, E. Ulmer, 1920. Dazu zahlreiche weitere Einzelliteratur. — 12) Rippel, A., S. 590. — 13) Benecke, W., Bakteriologie des Meeres. Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden. Abt. IX, Teil 5, 717 (insbesondere S. 761). Hier erschopfende Literatur über das Gebiet überhaupt. — 14) Bavendamm, W., Arch. f. Mikrobiol. **3**, 205 (1932). — 15) Rippel, A., S. 582 f. — 16) Rippel, A., S. 526, 591. — 17) Pringsheim, E., Planta (Berlin) **22**, 269 (1934). — 18) Schroeder, H., Naturwissenschaften **7**, 8 (1919); Die Stellung der grünen Pflanze im irdischen Kosmos. Berlin, Bornträger, 1920.

40. K. Stundl (Gelsenkirchen):

Bakterien und der Stoffhaushalt der Gewässer[1]).

Eine systematische Bearbeitung der durch Bakterien bewirkten Stoffumsetzungen im Wasser ist erst in jüngster Zeit erfolgt. Die früheren bakteriologischen Untersuchungen erstreckten sich meist nur auf die Feststellung der Keimzahl und des Bacterium coli und dienten hygienischen Zwecken.

In Anlehnung an die Methoden der Bodenbakteriologie wurden die chemischen Leistungen der Bakterien in Elektivnährböden geprüft. Aus diesen Befunden ging hervor, daß die Bakterien imstande sind, eine Reihe von Verbindungen ab- und umzubauen, und es zeigte sich weiter, daß fast jede Verbindung von Bakterien verarbeitet werden kann. Aus der Fülle dieser

1) Aus dem Hygienischen Institut des Ruhrgebiets zu Gelsenkirchen. Direktor: Prof. Dr. med. et phil. Max Gundel.

Befunde sollen nun zwei Punkte herausgegriffen werden: 1. die Bedeutung der bakteriell bedingten Umsetzungen bei der Selbstreinigung der Gewässer für Fischerei und Wasserwirtschaft und 2. die Umwandlung der Stickstoff- und Schwefelverbindungen im Wasser.

Das Wissen um den Anteil der Bakterien an der Umwandlung der gelösten Stoffe im Gewässer wurde durch das Studium des Selbstreinigungsvorganges sehr bereichert. Aus der Aufstellung des Saprobiensystems von Kolkwitz und Marsson ist zu ersehen, daß die starken Reduktionsprozesse in der polysaproben Zone nahezu gänzlich bakteriell bedingt sind. Die ersten Stadien der Mineralisation der organischen Verbindungen, vor allem der Abbau hochmolekularer Eiweißverbindungen, erfolgen durch die Tätigkeit zahlreicher Bakteriengruppen mit teilweise sehr spezialisiertem Stoffwechsel. Diese Umwandlung von Abfallstoffen in Nährstoffverbindungen, die für grüne Pflanzen assimilierbar sind, ist für die Erhaltung des tierischen Lebens in den Gewässern von ausschlaggebender Bedeutung, denn die Planktonpflanzen liefern der Tierwelt des Wassers einerseits die Nahrung, andererseits den lebensnotwendigen Sauerstoff.

Eine gewisse Zufuhr von Abfallstoffen erfolgt nun in jedem Gewässer, wenn die Planktonorganismen bei Nahrungsmangel oder zu Beginn der kalten Jahreszeit absterben und dann bakteriell zersetzt werden. Aus den zerfallenden Organismen werden durch Reduktionen und anschließende Oxydationsprozesse wieder Nährstoffe gebildet, die im Frühjahr zum Aufbau der bei wärmerem Wetter einsetzenden tierischen und pflanzlichen Hochproduktionen dienen. Diesen inneren Nährstoffkreislauf macht jedes Gewässer durch, ohne daß Störungen eintreten. Anders liegt der Fall, wenn ein Gewässer als Vorfluter für häusliche oder technische Abwässer dient. Hier ist der Verarbeitung der zugeführten Abfallstoffe eine Grenze gesetzt, die sich aus dem Verhältnis der Wasserführung des Vorfluters und der zugeführten Abwassermenge ergibt. Dabei ist naturgemäß auch die Art des Abwassers von Bedeutung, stark saure oder alkalische Zuflüsse verzögern die Selbstreinigung beträchtlich. Die Feststellung dieser Verhältnisse kann nicht durch eine einmalige Untersuchung erfolgen, sondern erfordert eingehende Probennahmen zu verschiedenen Jahreszeiten. Nach Untersuchungen von Viehl und eigenen erscheint die Oxydation von anorganischen Stickstoffverbindungen und von Phenolen in der kalten Jahreszeit gehemmt, während die bakteriell bedingte Reinigungswirkung des Vorfluters bei Zufuhr häuslicher Abwässer erst bei Temperaturen nahe dem Nullpunkt nachläßt. Besonders Oxydationsprozesse erscheinen in den Wintermonaten verzögert, da die Planktonpflanzen zu dieser Zeit nur in sehr geringem Maße vorhanden sind. Nun sind aber die Oxydationen als letzte Stufe der Selbstreinigung nicht ausschlaggebend für den Gewässerzustand, so daß praktisch die Reinigungswirkung und die Dauer der Stoffumwandlung im Sommer und Winter nicht sehr bedeutend verschieden erscheinen. Nur Frost wirkt deutlich verzögernd auf die Selbstreinigung.

Die Ueberwachung und Prüfung von Vorflutern ist eine überaus verantwortungsvolle Aufgabe, die nur von Wert ist, wenn sie nicht einmalig, sondern vielfach und erschöpfend durchgeführt wird. Die Abwassermenge wird unter Umständen zu groß für den Vorfluter bemessen oder die Abwasserzuleitung erfolgt in zu kurzen Abständen, so daß eine ausreichende Selbstreinigung nicht eintreten kann. Eine derartige Ueberbelastung führt u. a. zu ästhetischen Uebelständen, wie stinkender Fäulnis, schwimmenden Faulschlammflocken und einer starken Geruchsbelästigung in der wärmeren Jahreszeit, außerdem zur völligen Vernichtung des Fischbestandes. Tritt eine solche Ueber-

belastung bei Vorflutern ein, die mittelbar der Trinkwasserversorgung dienen und deren Wasser nach Filterung zur Anreicherung des natürlichen Grundwasserstandes herangezogen wird, wie dies im Ruhrgebiet der Fall ist, dann sind kostspielige Behandlungsverfahren nötig, um sanitäre Uebelstände zu vermeiden. So kann z. B. eine Ueberbelastung mit Kokerei- und Schwelereiabwässern den bakteriellen Phenolabbau verzögern, wobei es besonders im Winter zu erheblichen Geschmacksbelästigungen kommt.

Eine sorgfältige Ueberwachung der zugeleiteten Abwassermengen und der stattfindenden Reinigungsvorgänge ist hier besonders nötig, da durch das Ruhrwasser, das nach Durchlaufen von Anreicherungsbecken die Grundwassermengen vermehrt, die Wasserversorgung des ganzen rheinisch-westfälischen Industriegebietes in weitestem Ausmaße gedeckt wird. Um eine weitere, für die Wassergewinnung gefährliche Verunreinigung des Ruhrflusses zu verhindern, werden umfangreiche Reinigungsanlagen für die Industriewerke vorgeschrieben, ja es wurde sogar eine eben fertiggestellte große Zellstoffabrik stillgelegt, da ihre sulfithaltigen Abwässer die Selbstreinigung stark störten und die Trinkwassergewinnung der unterhalb liegenden Wasserwerke nach unseren gemeinsam mit Dr. Sierp vom Laboratorium des Ruhrverbandes durchgeführten Untersuchungen nachweisbar gefährdete.

Bei richtiger Abmessung der zugeführten Abwassermengen kann dagegen eine bedeutende Anreicherung der assimilierbaren Nährstoffe im Gewässer und damit eine beträchtliche Steigerung der Phytoplanktonproduktion erzielt werden. Eine derartige Erhöhung der Planktonpflanzenmenge ist für die Fischerei sehr wichtig, da hierdurch die Fischnahrung sehr vermehrt wird. Diese Methode der Teichdüngung nach Hofer durch richtig dosierte Abwasserzusätze ist erprobt und wirtschaftlich wertvoll.

Im Hinblick auf die Wichtigkeit der bakteriell bedingten Stoffumsetzungen ergibt sich die Frage nach dem Ablauf der Umwandlungsprozesse, ihrer Dynamik und den daran beteiligten Bakteriengruppen. Außerdem erscheint es nötig, den Gesamtumsatz der gelösten Stoffe in einem bestimmten Wasservolumen und die Zahl der dabei wirksamen Bakterien kennenzulernen. Derartige Untersuchungen, die den bakteriell bedingten Schwefel- und Stickstoffkreislauf erfaßten, wurden von Klein und Steiner im Lunzer Untersee und von Baier in Gewässern der näheren Umgebung Kiels angestellt. Ihre Ergebnisse sowie Befunde eigener Untersuchungen sollen nun kurz dargestellt werden.

Es fanden Klein und Steiner während der Frühjahrszirkulation einen starken Umsatz und eine große Zahl der Harnstoffspalter. Die Tätigkeit der Nitrifikanten wurde gegen den Herbst ansteigend und den Winter über intensiv bleibend gefunden. Bei eigenen Untersuchungen waren die Nitratmengen im Winter gegenüber den anderen Jahreszeiten stets deutlich erhöht, z. B. im Neufeldersee, einem durch Grundwasser aufgefüllten Braunkohlentagbau sowie in einigen westfälischen Talsperren. Inwieweit im Winter der hohe Nitratgehalt durch das Fehlen von assimilierenden Planktonpflanzen mitbedingt bzw. gefördert erscheint, ist noch nicht geklärt.

Die Denitrifikation beginnt im Frühjahr und steigt gegen den Sommer auf ein Maximum an. Bei den Untersuchungen im Neufeldersee wurde im März noch vor der Zunahme der Planktonvegetation ein starker Nitratrückgang von 8 mg/l auf 1 mg gefunden, der durch Denitrifikanten bewirkt war, wie aus gleichzeitig angelegten Kulturen erwiesen werden konnte. Eine jahreszeitliche bedingte Steigerung der Aktivität hatte Hüttig bei seinen denitrifizierenden Stämmen nachgewiesen, die im Frühjahr in bedeutend stärkerem

Maße Nitrat reduzierten als zu anderen Jahreszeiten. Auch Weimann und Willer hatten diesen Nitratrückgang vor dem Ansteigen der Planktonproduktion im Frühjahr beobachtet. Es kann durch diese starke bakterielle Nitratreduktion, die bis zur Bildung von freiem Stickstoff geht, ein völliges Fehlschlagen einer Teichdüngung mit Salpeter bewirkt werden. Fördernd auf die Denitrifikation wirken nach Fischer u. a. höhere Temperaturen und niedriger Sauerstoffgehalt. Im Neufeldersee trat der starke Nitratabbau in Uebereinstimmung damit auch nach den ersten wärmeren Tagen bei langsamem Temperaturanstieg auf.

Auch der Schwefelkreislauf zeigte jahreszeitliche Unterschiede. Klein und Steiner fanden Sulfatbildung am stärksten in den Oberflächenschichten auftretend. Während sie angeben, daß eine Reduktion der Sulfate nur unter anaeroben Bedingungen gefunden werden konnte, war bei eigenen Untersuchungen in salzhaltigen, flachen Gewässern im Burgenland auch bei aeroben Bedingungen Reduktion des Sulfats nachweisbar. Im allgemeinen aber geht der Sulfatabbau, besonders in tieferen Wasserschichten, mit starkem Sauerstoffschwund einher, wobei beträchtliche Mengen von Schwefelwasserstoff, der ein sehr starkes Gift für die Wassertiere darstellt, gebildet werden. Es kann aber auch — und das ist besonders bei Abwasserzuflüssen der Fall — durch Eiweißabbau das Auftreten dieses Gases hervorgerufen sein.

Um die Zahl der beim Schwefelumsatz beteiligten Bakterien zu erfassen, wurde ein Titerverfahren ähnlich dem Colititer nach Eijkman verwendet. Gleiche Volumina elektiver Nährlösungen wurden mit fallenden Wassermengen versetzt und aus der vorhandenen oder fehlenden Reaktion in den einzelnen Verdünnungen nach einer bestimmten Entwicklungszeit Schlüsse auf die ursprünglich im Wasser vorhandene Bakterienzahl gezogen. Die Zahl der Sulfatbildner schwankte im jahreszeitlichen Verlauf zwischen 50000 und 5000000, die der Sulfatreduzenten zwischen 1000 und 1000000 in 1 ccm.

Es sind nun alle diese Ergebnisse in Nährlösungen erzielt, deren Zusammensetzung eine ganz andere ist als die der untersuchten Gewässer. Aus diesem Grunde ist es klar, daß alle so gewonnenen Befunde mit Kritik gehandhabt werden müssen und nicht ohne weiteres mit den Vorgängen im freien Wasser gleichzusetzen sind. Es hat nun Baier derartige Untersuchungen in der Weise angestellt, daß er ähnlich, der Arbeitsweise der Bodenbakteriologie, zu einer bestimmten Menge Probenwasser — meist 100 ccm — den Stoff zusetzte, dessen Umwandlung oder Abbau verfolgt werden sollte. Die Ergebnisse seiner und eigener Untersuchungen erscheinen sehr günstig, und zweifellos kommt diese Arbeitsweise den natürlichen Verhältnissen im Wasser wesentlich näher als z. B. die Ermittlung der Zahl der im Gewässer vorhandenen Ammonifikanten auf Gelatineplatten mit Harnstoffzusatz. Denn wenn man ein Absterben wasserfremder Keime, wie Bacterium coli, bei längerem Aufenthalt in einer Talsperre feststellen kann, so ist doch gleichfalls anzunehmen, daß durch ein stark verschiedenes Medium, wie es eine hochkonzentrierte Nährlösung oder gar ein fester Nährboden darstellt, eine Aenderung oder zumindest eine Beeinflussung im Stoffwechsel der Bakterien eintreten kann. Daher erscheint die Arbeitsweise Baiers, die Umsetzungen im Probenwasser selbst mit geringen Substanzzusätzen zu prüfen, für eine Erfassung des natürlichen Vorganges sehr geeignet.

Wahrscheinlich wirken nun verschiedene Faktoren, und zwar nicht nur der Raumfaktor und die Nährstoffmenge, sondern auch gewisse, sehr labile toxische Stoffwechselprodukte der Bakterien — besonders in den Kulturen — begrenzend auf die Entwicklung ein. So wurde oft bei geringer Bakterienzahl

die physiologische Leistung wesentlich stärker gefunden als die größerer Bakterienmengen. Befunde dieser Art haben Baier, Klein und Steiner, Stundl bei ihren Untersuchungen erhalten.

Es ist zu ersehen, daß die Vertiefung und Ausdehnung derartiger Forschungen — es sei dabei nur wieder auf die Teichdüngung mit Abwasser und die Selbstreinigungsvorgänge im Ruhrflusse verwiesen — von großer Bedeutung für Wirtschaft und Hygiene sind. Bei gleichzeitiger Erfassung der Aktivität und der Zahl der beteiligten Bakterien wird, wenn damit auch die weitere naturgemäße Ausgestaltung der Nährsubstrate einhergeht, ein beträchtlicher Fortschritt in der so wichtigen Kenntnis des bakteriell bedingten Stoffkreislaufes der Gewässer erzielt werden können, wenn sich alle interessierten Kreise, Biologen, Chemiker und Hygieniker in gemeinsamer planmäßiger Arbeit zusammenfinden.

Schrifttum.

Baier, C. R., Studien zur Hydrobakteriologie stehender Binnengewässer. Arch. f. Hydrobiol. **29** (1935). — Hüttig, C., Untersuchungen an fluoreszierenden Bakterien. Ber. dtsch. bot. Ges. **47** (1929). — Klein, G., u. Steiner, M., Bakteriologisch-chemische Untersuchungen am Lunzer Untersee. Oesterr. bot. Z. **78** (1929). — Stundl, K., Chemisch-biologische Untersuchung des neuentstandenen Sees bei Neufeld a. d. Leitha, Burgenland. Int. Rev. d. ges. Hydrobiol. **34** (1937). — Ders., Limnologische Untersuchung von Salzgewässern und Ziehbrunnen im Burgenland (Niederdonau). Arch. f. Hydrobiol. **34** (1938). — Viehl, K., Einfluß der Temperatur und der Jahreszeit auf die Reinigungswirkung eines Stausees. Jahrb. „Vom Wasser" **8** (1937). — Waser, E., Husmann, W., Blochliger, G., Die Glatt. Ber. d. Schweiz. bot. Ges. **43** (1934). — Weimann, R., Chemisch-biologische Untersuchungen an einem Teich. Arch. f. Hydrobiol. **28** (1935). — Willer, A., Aus dem Stoffhaushalt unserer Gewässer. Naturwiss. Wschr. **1921**.

41. M. Gundel und K. Stundl (Gelsenkirchen):

Biologische Vorgänge in den Sandfiltern von Wassergewinnungsanlagen [1]).

In den Jahren 1915 und 1917 veröffentlichte K. Kißkalt seine grundlegenden Untersuchungen über das Wesen der Reinigung des Rohwassers in Sandfiltern. Nachdem man lange Zeit hindurch angenommen hatte, daß der sog. Filterhaut, einer dünnen, auf dem Sande auflagernden Schicht, die Reinigungswirkung zuzuschreiben sei, war es Kißkalt, der von dieser mehr mechanischen Deutung abging und das Vorhandensein biologischer Vorgänge auch in Modellversuchen erkannte. Wesentlich ist seine Feststellung, daß es eine Filterhaut im engeren Sinne des Wortes nicht gibt, daß sich erst beim Stillegen eines Filterbeckens aus Schwebestoffen ein Häutchen bildet und daß dieses von uns auch regelmäßig gesehene Kunstprodukt mit der Reinigungswirkung der Sandfilter und der Keimverminderung nichts zu tun hat.

Vor vielen Jahren war schon durch Emmerich, Stockvis, Schepilewski, Müller und Spiegel beobachtet worden, daß in bakterienreichen Abwässern eine starke Vermehrung der Protozoen feststellbar ist. Diese als Bakterienfresser bekannten Mikroorganismen bewirken nun nach den Angaben dieser Autoren eine starke Verminderung der im Wasser vorhandenen Bakterien. Die Vermehrung der Protozoen soll durch Stoffwechselprodukte

---

1) Aus dem Hygienischen Institut des Ruhrgebietes zu Gelsenkirchen (Direktor: Prof. Dr. med. et phil. Max Gundel).

der Bakterien gefördert und die Dauerstadien der Protozoen, die Zysten, sogar zu rascherer Entwicklung angeregt werden. Spiegel u. a. meinen sogar, daß die Protozoen bevorzugt gerade jene wasserfremden Keime verzehren, die als pathogene Darmbakterien auch in den Vorflutern und Wasserspendern unsere besondere Beachtung verdienen, und diese pathogenen Keime sollen geradezu von diesen Protozoen herausgesucht werden. Unterstrichen wird diese Behauptung durch die Ergebnisse ihrer Laboratoriumsversuche, daß in protozoenhaltigen Wasserproben die Zahl der Coli- und Typhuskeime rascher abnimmt, als es in protozoenfreien Kontrollproben gesehen wurde.

Diese Beobachtungen und auch die Feststellungen Kißkalts stellen die Protozoen in den Mittelpunkt des Reinigungsgeschehens in Vorflutern und Filteranlagen. Gegen diese Auffassung haben wir nach unseren Untersuchungsergebnissen viele Bedenken zu äußern, vor allem auch deswegen. da die meisten der genannten Autoren sich mit Laboratoriumsversuchen begnügten. In der Natur und in den Vorflutern spielen sich die Vorgänge aber wesentlich anders ab. Es ist (kritisch) zu bemerken, daß sich in den meisten der bisherigen Arbeiten Keimverminderung und Reinigungswirkung als identische Begriffe finden, während doch tatsächlich die Reinigungswirkung in den Vorflutern höchst vielgestaltige physikalisch-chemische und chemische sowie biologische Vorgänge darstellt und von sich aus keineswegs zu einer Keimverminderung fuhren muß (oft sogar im Gegenteil zu einer Keimvermehrung) und die Reinigungswirkung in den Sandfiltern auch nur zum Teil biologisch bedingt ist. Andererseits ist auch die Reinigungswirkung in den Sandfiltern gleichfalls ein sehr komplizierter Vorgang, bei dem die Keimverminderung selbst nur einen Teil der sich hier abspielenden Vorgänge darstellt. Uebrigens ist zu der bisherigen bevorzugten Stellung der Protozoen im Hinblick auf ihre wählerische Bevorzugung der darmpathogenen Keime zu sagen, daß diese wasserfremden Keime ja an und für sich schon draußen in der Natur als auch im Laboratoriumsversuch nicht zur Vermehrung in Wasserproben neigen. Sie sterben vielmehr nach einiger Zeit schon normalerweise ab, wie es sehr eindrucksvoll auch unsere bisher noch unveröffentlichten Untersuchungen in Stauseen und Talsperren zeigen. Da nun weiter die Protozoen diese Keime durch ihre Freßtätigkeit vermindern, muß die Verringerung der wasserfremden Keime in protozoenhaltigen Wasserproben deswegen schon größer erscheinen als die der Wasserkeime, da sie ja ihre Verluste durch Protozoenfraß durch ihre eigene Vermehrung mehr oder minder stark ausgleichen. Die u. E. zum Teil teleologischen Deutungsversuche wie auch die von Schepilewski u. a. geäußerten Ansichten über die Anregung der Protozoenvermehrung durch Stoffwechselprodukte und Autolysate der Bakterien sind dahin richtigzustellen, daß Vorfluter und nicht allzu stark verunreinigte Abwässer überaus reichhaltige Nährlösungen darstellen. Die Annahme, daß die Protozoen die wasserfremden, der Trinkwasserversorgung gefährlichen Bakterien heraussuchen und gerade sie besonders gern verzehren, erscheint uns völlig abwegig und heißt diesen Urtierchen ein Wahlvermögen zuzuschreiben, das weder durch die Laboratoriumsversuche noch durch unsere täglichen Erfahrungen draußen im Vorfluter gerechtfertigt erscheint.

K. Kißkalt ging nun mit exakter Methodik an ein Studium der Wasserreinigungsprobleme heran, indem er vornehmlich bei Sandfiltern Zulauf und Ablauf biologisch prüfte. Den Anteil der Protozoen an den von ihm festgestellten Keimverminderungen wies er durch Heranziehung protozoentötender chemischer Mittel nach. Kurz nach der Vergiftung des Filters stiegen die Keimzahlen beträchtlich an. Das Problem der Sandfilterung wurde auf Grund dieser Versuche als vorwiegend biologisch bezeichnet und die große Bedeu-

tung der Protozoen erschien danach in ihrem ursprünglichen Wert für die Keimverminderung in Sandfiltern bewiesen.

Die wertvollen, von Liebmann und Viehl durchgeführten Untersuchungen über die Selbstreinigungsvorgänge im Abwasser und den Anteil der Protozoen an diesen Geschehnissen in den Jahren 1936 und 1937 führten zu dem Ergebnis, daß durch die bisherige Außerachtlassung der chemischen Umsetzungsvorgänge falsche Bilder erhalten worden seien. Liebmann erklärte die Protozoen nur als Nutznießer der reichen, sich bei den Selbstreinigungsvorgängen entwickelnden Bakterienflora und spricht ihnen jede Bedeutung für die Selbstreinigung ab. Nach Viehl sollen die Protozoen nur die Ausflockung der Kolloide beschleunigen und den Trübungsgrad des Wassers herabsetzen, ohne aber sonst irgendeine Bedeutung hinsichtlich der eigentlichen Reinigung der Abwässer zu besitzen.

Wir erkennen damit 3 recht gegensätzliche Auffassungen: 1. Die Gruppe um Emmerich sieht in den Protozoen Bakterienfresser größten Formats im Sinne von Wasserreinigern. 2. K. Kißkalt erkennt in den Protozoen den ursächlich für die Keimverminderung in Sandfiltern verantwortlich zu machenden Faktor. 3. Liebmann und Viehl halten die Protozoen bei den Fragen der Abwasserreinigung für weitgehend bedeutungslos.

Diese scheinbar unüberbrückbaren Gegensätze führten uns im Hinblick auf die besonderen Schwierigkeiten der Wassergewinnung im rheinisch-westfälischen Industriegebiet mit der Ruhr als dem wichtigsten Wasserspender und gleichzeitig bedeutungsvollem Vorfluter und der Art der Wassergewinnung mit ihren zahllosen Anreicherungsbecken zu einem eingehenden Studium der sich bei der Wasserreinigung abspielenden Vorgänge in physikalisch-chemischer, chemischer und biologischer Hinsicht. Diese über Jahre angelegten Versuche brachten uns schon nach etwa einem Jahr manchen wertvollen Einblick, über den in Kürze berichtet sei. Uns interessiert hierbei einmal die Existenz und Arbeitsweise der sogenannten und viel zitierten Filterhaut und andererseits das Problem der Wasserreinigung im Sandfilter selbst. Zur Technik unserer Untersuchung sei nur ganz kurz gesagt, daß wir Glaszylinder in die Sandfilter der Filterbecken so einsetzen, daß der obere Rand des sandgefüllten Zylinders mit der Oberfläche des Filtersandes abschloß. Ueber die Betriebszeit der einzelnen Filterbecken wurde eine mehr oder minder große Zahl von Zylindern eingesetzt, die in gewissen Zeitabständen mittels einer besonderen Konstruktion herausgenommen wurden und die uns dann genau jene Vorgänge widerspiegeln, wie sie sich tatsächlich in den verschiedenen Schichten der Sandfilter der Anreicherungsbecken abspielen. Aus den Zylindern wurden dann aus den einzelnen Schichten Sandproben entnommen und diese chemisch, biologisch und bakteriologisch unter aeroben und anaeroben Bedingungen untersucht.

Wir erkannten, daß der stärkste Keimabfall in den obersten Sandschichten zu finden ist, sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen. Beispielsweise betrug in einem Anreicherungsbecken am 17. 3. 1938 der aerobe Keimgehalt in der Oberflächenschicht 562000 in 1 g Sand, in der 5 cm tiefer liegenden Sandschicht 237000; am 8. 4. 1939 in der Oberflächenschicht 3500000 und in 5 cm Tiefe nur 430000. Die Zahl der anaerob wachsenden Keime war in der Oberflächenschicht am 17. 3. 1938 369000, in 5 cm Tiefe nur 59000. Entsprechend nimmt die Zahl der Colikeime ab. Während beispielsweise in der Oberflächenschicht noch in 1 g Sand Millionen Colikeime nachweisbar sind, finden sich in 25 cm Tiefe nur noch etwa 20 Colikeime in 1 g Sand. In der Filterschicht erfolgt damit eine immer weiter fortschreitende Keimverminderung, wobei sich die Filter im Laufe ihrer Ein-

arbeitung sozusagen entwickeln. Durch abgesetzte Schwebestoffe, Bakterienleichen, Schlammstoffe usw. setzen sich die Zwischenräume des Sandfilters mehr und mehr zu. Das durch das Filter sickernde Wasser, das durch die zahllosen kapillaren Rinnen fließt und dadurch einen sehr viel längeren Weg zurücklegt, als er der Dicke der Filtersandschicht entsprechen würde, tritt durch diese mechanisch reinigenden Filterporen unter normalen Temperaturen langsam hindurch, wobei sich gleichzeitig chemische Umsetzungen durch Bakterien im Wasser abspielen. Dem Wasser wird in den tieferen Schichten mehr und mehr Sauerstoff entzogen, so daß die Zahl der aerob wachsenden Bakterien in den tieferen Schichten abnimmt. Naturgemäß bedingt die immer stärkere mechanische Filterung auch eine Abnahme der anaeroben Bakterien. Der Keimabfall geht aber bei den Anreicherungsbecken weit über die eigentliche Filtersandschicht hinaus und erheblich in den gewachsenen Boden hinüber, denn in den untersten Filterschichten finden sich immer noch Tausende von Keimen, die erst während der Passage des Wassers durch den gewachsenen Boden zurückgehalten werden und in den Sammelgalerien bei normalen Witterungsverhältnissen nicht mehr zu finden sind. Erst im Winter, bei tiefer fallenden Temperaturen und dem Aufhören der Selbstreinigungskräfte im Wasserspender sind die Sandfilter und selbst zum Teil der gewachsene Boden nicht mehr zu der oben geschilderten gewaltigen Keimverminderung in der Lage. Die Keimminderung läßt mehr und mehr durch die beträchtliche Belastung der Filter wegen der fehlenden Selbstreinigung im Vorfluter nach. Der Boden zeigt mit seiner absinkenden Bodentemperatur gleichfalls geringere Filtrationskraft und die Wassergewinnung verlangt in diesen kritischen Zeiten besondere Aufmerksamkeit.

Nach den geschilderten Befunden können für den erheblichen zahlenmäßigen Rückgang der Bakterien die Protozoen nicht ausschließlich verantwortlich gemacht werden, weil sie 1. nach den Untersuchungen von Liebmann und eigenen Feststellungen nur, abgesehen von geringen Ausnahmen, unter aeroben Verhältnissen gedeihen, und da wir 2. nur in den obersten Sandschichten der Filterbecken Ziliaten fanden, die hingegen reichlich im Schwebeschlamm über der obersten Sandschicht und im darüberstehenden Wasser gefunden wurden. Wir haben es also nicht mit der alleinigen oder überwiegenden Arbeit der Protozoen zu tun, sondern mit einem Neben- und Miteinander der verschiedenartigsten biologischen und chemischen Vorgänge. Die Protozoen sind allein von teilweiser Bedeutung in der obersten Sandschicht, während sie in den unteren, aber gleich wichtigen Sandschichten fehlen bzw. von gänzlich untergeordneter Bedeutung sind.

Auch die sich im Filtersand abspielenden chemischen Vorgänge wurden von uns nach verschiedenen Richtungen untersucht. Die stärksten Umsetzungen fanden sich im Schlamm über dem Filtersand und in den obersten Sandschichten des Filters. So wurde in einem kurz vorher stillgelegten Filterbecken in der Schlammschicht an der Oberfläche und im Filtersand in 2 cm Tiefe trotz der Unterbringung der entsprechenden Kulturen in Uebereinstimmung mit der Außentemperatur bei nur 2—4° C starke Ammonifikation und Nitrifikation, gleichzeitig aber Denitrifikation mit Nitratbildung und Zelluloseabbau gefunden. Auch die Sulfatbildung und die Reaktionsvorgänge zeigen starkes Ausmaß in der Schlammschicht und eine deutlich geringere Aktivität in den obersten Sandschichten. Demgegenüber spielen sich in den unteren Sandfilterschichten wohl die gleichen Reaktionen, aber in sehr viel geringerer Intensität ab. Während (nach Viehl u. a.) sich die Selbstreinigungsvorgänge im stehenden Abwasser nacheinander abwickeln, beginnend mit dem Abbau der organischen Stickstoff- und Phosphorverbindungen und

endend mit der Mineralisation, erkennen wir bei der Reinigung des Flußwassers in den Anreicherungsbecken dieselben Vorgänge nicht hintereinander, sondern nebeneinander, also gleichzeitig stärkste Reduktion und Oxydation.

Diese Vorgänge sind selbst im Ruhrfluß in Abhängigkeit von Quantität und Qualität der Abwässer verschiedenartig, und es muß zukünftiger Forschung überlassen bleiben, im Hinblick auf Fragen der Wassergewinnung gegebenenfalls zu gewissen Steuerungen dieser Vorgänge zu gelangen.

Dieser kurze Abriß der überaus vielgestaltigen und besonders interessanten Vorgänge bei der Reinigung des Wassers in Sandfiltern möge zu noch weiterer Erforschung anregen, denn es steht außer Zweifel, daß die genaue Kenntnis der sich hierbei abspielenden Vorgänge für Fragen der Hygiene des Trinkwassers und für die Probleme der Trinkwassergewinnung und Abwasserbeseitigung von außerordentlich großer Bedeutung ist. Eine große Fülle von Fragestellungen harrt der Bearbeitung, die nur durch die Zusammenarbeit von Hygienikern, Hydrologen und Chemikern in befriedigender Weise beantwortet werden kann.

Schrifttum.

Kißkalt, Untersuchungen über Trinkwasserfiltration. 1. Theorie der langsamen Sandfiltration. Z. Hyg. **80** (1915). 2. Storungen bei der Sandfiltration und ihre Erklärung durch die biologische Theorie. Z. Hyg. **83** (1917). — Liebmann, Auftreten, Verhalten und Bedeutung der Protozoen bei der Selbstreinigung stehenden Abwassers. — Müller, A., Einfache Anaerobenzüchtung in Kulturschalen und Reagenzgläsern. Zbl. Bakter. I Orig. **140**, 66 (1937). — Müller, P., Ueber die Rolle der Protozoen bei der Selbstreinigung stehenden Wassers. Arch. f. Hyg. **75** (1912). — Schepulewski, Ueber den Prozeß der Selbstreinigung der natürlichen Wässer nach ihrer künstlichen Infizierung durch Bakterien. Arch. f. Hyg. **72** (1910). — Spiegel, Ueber die Vernichtung von Bakterien im Wasser durch Protozoen und über die Fähigkeit der Bodenmassen, Bakterienfilter zu durchdringen. Arch. f. Hyg. **80** (1913). — Stockvis, C. I., Protozoen und Selbstreinigung. Arch. f. Hyg. **71** (1909). — Viehl, K., Der Einfluß der Temperaturen auf die biologische Abwasserreinigung. Ges.-Ing. 1935. — Ders., Untersuchung über das Wesen der Selbstreinigung und der künstlichen biologischen Reinigung des Abwassers. Z. Hyg. **119** (1937).

42. W. Schwartz (Karlsruhe) und Th. Zeiser (Karlsruhe):

Mikrobiologische Untersuchungen über die Haltbarkeit kaltgelagerter See- und Süßwasserfische [1].

Es ist bekannt, daß die Haltbarkeit geschlachteter Fische sehr kurz bemessen ist und daß namentlich in der heißen Jahreszeit die Versorgung des küstenfernen Binnenlandes mit frischen Seefischen von einwandfreier Qualität Schwierigkeiten macht.

Als begrenzender Faktor für die Haltbarkeit der Fische ist in erster Linie die Lebenstätigkeit und Vermehrung der auf der Fischoberfläche und in der Fischmuskulatur vorhandenen Bakterien anzusehen.

In früheren Untersuchungen hat W. Schwartz die Vorgänge der Infektion beim Fang und beim Schlachten der Seefische an Bord des Fischdampfers aufgeklärt und gemeinsam mit dem Institut für Seefischerei in Wesermünde den Anstieg der Keimzahlen auf dem Weg von der Küste bis in das Binnenland verfolgt.

---

1) Aus dem Botanisch-Mikrobiologischen Institut der Technischen Hochschule Karlsruhe (Direktor: Prof. Dr. W. Schwartz).

Jetzt wurden gemeinsam mit Zeiser in umfangreichen Laboratoriumsversuchen die Zusammenhänge zwischen den Lagerungsbedingungen (wie z. B. Lagertemperatur, Menge der anfänglich auf der Fischoberfläche vorhandenen Bakterien, Kohlensäurebegasung) und der Haltbarkeit bei See- und Süßwasserfischen aufgeklärt.

Die ausführliche Arbeit erscheint im Archiv für Mikrobiologie.

43. Walther Kruse (Leipzig):

Nachteile der Chlorung des Wassers und ihre Beseitigung durch Versilberung (Cumanisierung) [1].

Der vorliegende Gegenstand beschäftigt mich seit 10 Jahren, aber erst seit 1936 habe ich darüber geschrieben und gesprochen, zuletzt auf der Hygienikertagung in Berlin. Weil damals eine Aussprache darüber nicht möglich war, eine solche aber wegen der großen Wichtigkeit der Sache sehr nötig ist, habe ich diesen Vortrag angekündigt. Von vielen Seiten wird zwar die Chlorung des Trink- und Badewassers als eine einwandfreie Methode betrachtet, um Wasser von Krankheitskeimen zu befreien, und man ist um so schneller bei der Hand, sie zu empfehlen, als sie recht billig ist. Dabei vergißt man leider gar zu oft, daß die Chlorung, wie man schon vor 25 Jahren, als man sie einführte, wußte, nur ein Notbehelf ist, nicht ein einwandfreies Verfahren, und daß es allmählich höchste Zeit geworden ist, die Chlorung durch eine weit bessere Methode, die nunmehr seit fast 8 Jahren sich im Großen erprobt hat, nämlich die Versilberung des Wassers nach dem Cumasinaverfahren zu ersetzen. Kurz gesagt, handelt es sich um folgende Schäden der Chlorung:

1. Der Geruch und Geschmack des gechlorten Wassers verleidet jedem Menschen mit normalen Sinnen den Genuß beim Trinken, Waschen, Baden und Schwimmen, widerspricht also dem alten hygienischen Grundsatz: ariston men hydor, zu deutsch: Trink- und Badewasser kann nicht gut genug sein, wenn man Freude daran haben will.

2. Bei längerem Gebrauch gechlorten Wassers, insbesondere natürlich beim Baden und Schwimmen, stellen sich Reizungen der Haut und Schleimhäute ein, die nicht selten zu richtigen Erkrankungen führen. Wer das noch immer leugnen will, lese nur die Ergebnisse der Rundfrage, die Wolfgang Reitz auf meine Veranlassung im Jahre 1937 bei Hunderten von deutschen Schwimmvereinen veranstaltet hat: sie sind einstimmig in der Verurteilung der Chlorung.

3. Bezeichnenderweise leiden die Wäsche und die Badekleidung noch mehr unter dem Chlor als die Menschen.

4. Nicht ganz selten werden bei Benutzung von Chlorgas zur Desinfektion durch Ausströmen von Chlor Unfälle beobachtet. Freilich bleiben sie, weil sie gewöhnlich nur die Angestellten betreffen, allermeist geheim und werden möglichst vertuscht.

---

1) Leipzig O 27, Bozener Weg 28.

5. Am schlimmsten sind aber die Schwierigkeiten bei der Dosierung des Chlors: man schwebt gewissermaßen immer zwischen Scylla und Charybdis, weil ein Zuviel an Chlor für die Benutzer des Wassers unerträglich ist, und ein Zuwenig Infektionsgefahren bedingt. Das beste Beispiel dafür ist die große Typhusepidemie in Hannover von 1926. Aller Wahrscheinlichkeit nach sind dergleichen Vorkommnisse bei kleineren Wasserversorgungen gar nicht selten.

Nun sagen die Verteidiger der Chlorung: wir haben Mittel, diese Schädigungen zu bekämpfen. Das ist aber nur in recht beschränktem Grade der Fall:

a) Nur bei Benutzung des Chlors zur Desinfektion kleinster Wassermengen läßt sich das Chlor vollständig vor dem Gebrauch neutralisieren und dadurch jeder Schaden verhüten. Bei sehr großen Wasserversorgungen ist eine solche Neutralisierung schon viel schwieriger durchzuführen, und bleiben immer noch Gefahren übrig; bei kleineren Versorgungen, wo die notwendige ständige Kontrolle fehlt, ist die Neutralisierung kaum, und in Bädern überhaupt nicht möglich.

b) Alle bisherigen Versuche, das Chlorungsverfahren selbst zu verbessern, z. B. durch Benutzung unterchloriger Säure, sind im wesentlichen gescheitert. Das vielgerühmte Stadionbad im Berliner Reichssportfeld stinkt schon in weiter Entfernung nach Chlor.

Es bleibt also nichts übrig als die Chlorung zu ersetzen. Das geschieht durch die Versilberung bzw. Cumanisierung des Wassers. Zahllose Laboratoriumsversuche, die ich mit Maximilian Fischer, zum Teil in sehr großem Maßstabe, seit 1930 ausgeführt habe, dann die Cumanisierung des großen Stadtbades in Leipzig, die sich nunmehr seit fast 8 Jahren glänzend bewährt hat, und eine Reihe kleinerer Ausführungen in Wasserversorgungen und Bädern, liefern den Beweis dafür. Die winzigen Mengen aktiven Silbers, die zur Desinfektion des Wassers ausreichen — sie sind 10—20mal geringer als beim Chlor — sind für die Sinne überhaupt nicht spürbar und auch sonst völlig unschädlich. Selbst starke Ueberdosierung ändert daran nichts. Die Dosierung selbst ist so einfach wie möglich, der Cumasterilisator so klein und handlich wie denkbar, Unfallsgefahr selbstverständlich ausgeschlossen. Algen werden durch unser Silber mindestens so gut beseitigt, wie durch Chlor, Eisenbakterien nur durch Silber.

Natürlich hat man auch Einwände gegen die Cumanisierung erhoben, sie sind aber samt und sonders hinfällig.

1. Der scheinbar wichtigste betrifft die Zeitdauer, die zur Wasserdesinfektion nötig sein soll. Beim Chlor beträgt sie, wenn man größere Gaben benutzt, allerdings nur wenige Minuten, beim aktiven Silber ebensoviel Stunden. Das klingt sehr überzeugend zugunsten des Chlors. Die Wirklichkeit sieht aber ganz anders aus. Niemals darf man in Wasser — außer bei kleinsten Wassermengen (s.o.) — die Chlorgaben so hoch nehmen, daß schnelle Wirkungen erreicht werden, weil sie für den Verbraucher unerträglich sind, man muß sich vielmehr mit geringeren Chlormengen begnügen, die eben ausreichen, um binnen 4—6 Std. die Desinfektion zu vollenden, genau also wie beim Silber. Das hat schon H. Selter gefordert, als er vor 25 Jahren in meinem Laboratorium die Chlorung studierte. Daraus ergibt sich die Folgerung für die Praxis, daß man bei der Cumanisierung wie bei der Chlorung Vorratsbehälter bereitstellen muß, die dem Trinkwasser rund 6 Std. nach dem Zusatz des Desinfektionsmittels Zeit lassen, bevor es verbraucht wird. Bei der Chlorung ist das, wie ich wohl weiß, bisher oft nicht geschehen, aber

mindestens auch deswegen ebenso nötig, weil man auf diese Weise dem Chlor Zeit gibt, möglichst aus dem Wasser wieder zu verschwinden. So mildert man wenigstens die Nachwirkungen des Chlors auf die Benutzer des Wassers, wenn man sie auch nicht immer ganz vermeidet, und die übrigen Nachteile der Chlorung nicht beseitigt werden. In Bädern dient natürlich das Badebecken selbst als Vorratsbehälter. Hier zeigt sich auch ein weiterer Vorteil der Versilberung gegenüber der Chlorung: das aktive Silber reichert sich im Becken deutlich an, so daß zufällige oder absichtliche Unterbrechungen der Silberzufuhr nichts für die Desinfektion ausmachen, während eine Anreicherung des Chlors für die Verbraucher zu unerträglichen Zuständen führt, und eine Unterbrechung der Zufuhr die Desinfektion sofort beeinträchtigen muß.

2. Weitere Einwände beruhen auf unrichtiger Beurteilung der bakteriologischen Befunde im Badewasser. Zunächst stellt man ganz unberechtigte Forderungen bezüglich der Coliprobe. Jeder Hygieniker weiß, daß offene Wässer selbst als Trinkwasser noch zulässig sind, wenn sie gewöhnlich in 1 ccm keine Colibazillen enthalten. Manche Bakteriologen verlangen aber ganz überflüssigerweise, daß Badewasser selbst in 100 ccm frei sein soll von Colibazillen. Da nun nach vielhundertfachen Prüfungen das cumanisierte Wasser des Leipziger Stadtbades niemals Colibazillen in 1 ccm, aber manchmal in 10—100 ccm enthalten hat, wird das in Gegensatz gestellt zu gechlortem Badewasser, das solchen Ansprüchen immer genügen soll. Tatsächlich ist das aber, wenn man das Schrifttum durchsieht (Ditthorn, Bruns, Remy, S. Hoffmann), keineswegs der Fall, vielmehr ein Colifund gar nicht selten. Man bekommt durchaus den Eindruck, daß vollständiges Fehlen von Colibazillen nur durch Ueberdosierung des Chlors mit allen seinen schädlichen Folgen erkauft wird. Im einzelnen werde ich auf diesen Gegenstand in der demnächst erscheinenden Arbeit im Archiv für Hygiene und Bakteriologie eingehen, ebenso auf die Bedeutung der üblichen Keimzählung. Auch in dieser Beziehung stellt man ganz übertriebene Anforderungen. Man verlangt dieselben Verhältnisse wie in filtriertem Flußwasser, d. h. Keimzahlen, die möglichst unter 100 im ccm bleiben, und vergißt dabei, daß es sich in Bädern um stehende Wässer handelt, die ganz anders zu beurteilen sind, als fließendes Wasser, da dort die sog. Wasserbakterien, also ganz harmlose Keime, ihr geradezu unberechenbares Spiel treiben. So kommt es, daß Tausende, ja Zehn- und Hunderttausende von Bakterien im ccm der Badewässer gefunden werden, die sich durch die Coliprobe als ganz unverdächtig erweisen, und zwar gleichgültig, ob die Badewässer durch Chlor oder Silber desinfiziert werden. Freilich bekommt man dergleichen besonders dann zu sehen, wenn man nicht die übliche Keimzählung in Gelatine am 3. Tage und nach Züchtung bei 22° vornimmt, sondern wie Remy es getan hat, die Gelatineplatten 3—7 Tage beobachtet, oder wie wir es beim Leipziger Stadtbade durchgeführt haben, das Wasser auf Agarplatten bei 27° züchtet. Dabei zeigt es sich, daß die Höhe des Chlorüberschusses innerhalb der üblichen Grenzen und ebenso die Silbermengen auf die Keimzahlen keinen deutlichen Einfluß haben. Nur wenn man die Chlorzusätze über das erträgliche Maß steigert, erhält man sicher niedrige Keimzahlen. Der selbstverständliche Schluß aus diesen Erfahrungen ist, daß man die Keimzahlen, die man aus Badewässern bekommt, als ganz nebensächlich betrachten und sich allein auf die Coliprobe verlassen soll.

3. Durch die Erfahrung hat sich bekanntlich gezeigt, daß das gechlorte Wasser in Badebecken, die regelmäßig durch Filter umgewälzt werden, nicht nur wochen-, sondern monatelang ohne wesentliche Veränderungen seiner physikalischen Eigenschaften gehalten werden kann. Nun glaubt man schon

aus theoretischen Gründen dem aktiven Silber keine derartige Wirkung zuschreiben zu sollen, weil es nicht die Fähigkeit besitze, wie das Chlor organische Stoffe aufzulösen. Ganz abgesehen davon, daß wir über die eigentlichen Ursachen dieser Klarhaltung des Badewassers durch die Chlorung nicht unterrichtet sind, stimmt es auch nicht, daß Silber gegenüber organischen Stoffen versagt. Jeder Laboratoriumsversuch z. B. mit Wasser, dem Spuren von Urin zugesetzt sind, beweist das Gegenteil: das aktive Silber besitzt sehr starke bindende bzw. neutralisierende Fähigkeiten, nicht bloß für übelriechende Stoffe, wie Schwefelwasserstoff, sondern auch für Urin und andere organische Stoffe. Vor allen Dingen lehrt aber die vieljährige Erfahrung im Leipziger Stadtbad, daß cumanisiertes Wasser mindestens ebensolange ohne Erneuerung im Badebecken gebrauchsfähig gehalten wird wie gechlortes. Nur treten fast regelmäßig im Leipziger cumanisierten Bade vorübergehende Trübungen auf, wenn das Beckenwasser, wie es jede Woche einmal geschieht, im sog. Wellenbade stärker aufgewühlt wird. Wer ohne das zu wissen, in solchen Zeiten das Badewasser sieht, wundert sich über die Trübungen, würde aber sie mit Unrecht auf die Cumanisierung beziehen, weil sie natürlich auch durch Wellenbäder in gechlortem Wasser verursacht werden.

4. Schließlich wendet man gegen die Versilberung des Wassers ein, sie sei erheblich kostspieliger. Das ist nur insofern richtig, als der hohe Silberpreis die stärkere Wirkung des Silbers nicht ausgleicht. Aber man vergißt bei dieser Rechnung, daß die Mehrkosten der Versilberung gegenüber der Chlorung absolut genommen z. B. für eine Wasserversorgung oder ein Bad mittlerer Größe nur einige Hundert Mark jährlich betragen, also gegenüber den sonstigen Kosten solcher Anstalten gar nicht ins Gewicht fallen, vergißt vor allem aber die gewaltigen hygienischen Vorteile der Cumanisierung des Wassers vor der Chlorung. Darauf hinzuweisen, halte ich für eine dringende Aufgabe der Hygiene.

44. H. Anton (München):

Die Technik der Untersuchung von chloriertem Hallenschwimmbadwasser [1]).

Bei der Durchführung von Untersuchungen, die uns die Unterlagen zu gutachtlicher Aeußerung über verschiedene in den letzten Jahren in Vorschlag gebrachte Verfahren der Badewasseraufbereitung erbringen sollten, haben wir Erfahrungen gesammelt, die uns zu einer kritischen Beurteilung der bei der Untersuchung von Hallenschwimmbädern bisher angewandten Methoden geführt haben. Das die hygienische Beurteilung von Hallenschwimmbädern betreffende Schrifttum ist außerordentlich umfangreich, aber voll von Widersprüchen.

Im Jahre 1934 bereits ist von Remy nachhaltig die Forderung erhoben worden, für eine einheitliche Durchführung der Untersuchung chlorierter Wässer jeglicher Art Sorge zu tragen. Eine Aufstellung von Richtlinien, wie sie zu diesem Zwecke von Remy gefordert wurde, ist jedoch bisher unterblieben.

1) Aus dem Hygienischen Institut der Universität München (Direktor: Geh.-Rat Prof. Dr. K. Kißkalt).

In jüngster Zeit ist die Frage der hygienischen Beurteilung chlorierter Badewässer dadurch besonders aktuell geworden, daß von verschiedener Seite Angriffe gegen das Verfahren der Chlorung des Badewassers geführt wurden. Diese Angriffe wurden zum Teil auch begründet mit den Widersprüchen in den Angaben über den Erfolg der Chlorierung. Wir haben uns nun die Frage vorgelegt: Welche Dinge müssen bei der bakteriologischen Untersuchung von Hallenschwimmbädern und bei der Beurteilung der Ergebnisse beachtet werden?

Ich habe keineswegs die Absicht, mich an dieser Stelle in den Streit um das zweckmäßigste Verfahren der Badewasseraufbereitung einzumischen.

Bei den folgenden Ausführungen halte ich mich an Unterlagen, die uns durch persönliche Fühlungnahme mit anderen Instituten und durch das Studium der im Schrifttum niedergelegten Angaben anderer Untersucher über die von ihnen angewandte Methodik bekanntgeworden sind.

Wenn ich mich dabei auch in Uebereinstimmung mit meinem Thema vorwiegend auf die Untersuchung von chlorierten Wässern beschränke, so soll damit keineswegs gesagt sein, daß meine Ausführungen nur für die Untersuchung chlorierter Badewässer zutreffen. Sie werden sich im Gegenteil auch bei der Untersuchung mit anderen Verfahren behandelter Badewässer, gegebenenfalles unter zweckentsprechender Abänderung, mit Vorteil auswerten lassen.

Die erste Frage ist die: Wo soll entnommen werden? Das grundsätzliche Schema der Anlage eines Hallenbades, das mit Umwälzung und Chlorierung des Badewassers arbeitet, ist bekannt. Das Wasser ist hierbei einem Kreislauf unterworfen. Aus dem Becken fließt während der Umwälzung ständig Wasser ab und einem Filter zu. Nach Passieren der Filteranlage wird es in der Regel durch eines der bekannten Verfahren chloriert und läuft nun nach Passieren eines mehr oder minder langen Rohrsystemes dem Becken wieder zu. Grundsätzlich ist zunächst einmal darauf hinzuweisen, daß die alleinige Untersuchung des dem Becken zufließenden Wassers für die hygienische Beurteilung eines Verfahrens der Badewasseraufbereitung natürlich nicht ausreichend ist. Selbst in dem Idealfalle, daß dieses Wasser keimfrei, also bakteriologisch bestem Trinkwasser ebenbürtig, dem Becken wieder zufließt, ist über die Verhältnisse im Becken selbst und damit über den Wert oder Unwert des ganzen Verfahrens nur sehr wenig ausgesagt.

Gewiß wird sich bei sehr ausgiebiger Umwälzung eine ständig anhaltende und unter Umständen auch durchaus beträchtliche Verminderung der Keimzahlen im Becken ergeben, aber da der Beckeninhalt hierbei nur fortlaufend verdünnt wird, ist eine quantitative Ausschaltung von Krankheitserregern, die nun einmal in das Schwimmbecken gelangt sind, auf diesem Wege nicht möglich. Das Problem läßt sich nicht einmal, wie ich nachfolgend an Hand eines von uns durchgeführten Färbeversuches des Schwimmbeckenwassers belegen werde, rechnerisch verfolgen. Die Verteilung des in das Becken eingeleiteten aufbereiteten Wassers im Becken ist so ungleichmäßig, daß eine rechnerische Behandlung keinen Zweck hat.

Das einzig Entscheidende sind die im Schwimmbecken selbst angetroffenen Verhältnisse. Besonders für den Vergleich der Leistungsfähigkeit verschiedener in verschiedenen Bädern angewandter Verfahren der Badewasseraufbereitung kann die Ermittlung einer mittleren Keimzahl, wie sie von verschiedenen Untersuchern angestrebt wurde, von Vorteil sein. Grundsätzlich ist aber dazu zu sagen, daß uns als Hygieniker nicht so sehr ein Mittelwert wie die Verhältnisse an den ungünstigsten Stellen interessieren müssen. Wenn ein Institut

uns mitteilte: „Die Entnahme fand unter sorgfältiger Vermeidung der toten Ecken statt", so halten wir das für falsch.

Wir konnten durch das Entgegenkommen von Herrn Lutz, dem Direktor der städtischen Bäder in München, an einem Tage, an dem das Müllersche Volksbad für die Besucher geschlossen war, einen groß angelegten Versuch anstellen, der uns Aufschluß geben sollte, wie ungleichmäßig die Verteilung des dem Becken zufließenden aufbereiteten Wassers nun eigentlich ist. Wir haben dieses Wasser mit Fuchsin gefärbt. Ich kann auf diesen interessanten Versuch, über den ich an anderer Stelle ausführlich berichten werde, hier nur kurz eingehen. Wir haben den ganzen Vorgang der Einleitung des gefärbten Wassers und seines Vordringens im Becken aus der Kuppel der Schwimmhalle von drei Stellen aus photographisch festgehalten. Ich zeige Ihnen ein Diapositiv, auf dem die einzelnen Aufnahmen geordnet zusammengestellt sind. Man sieht sehr schön, wie die Farbwolke sich im Becken relativ rasch vorschiebt, wie aber von Anfang an die Verteilung eine ungleichmäßige ist. Die Aufnahmen umfassen einen Zeitraum von etwa 90 Min.[1]). Wir haben daneben fortlaufend an 22 verschiedenen Stellen des Beckens oben und unten Proben zur kolorimetrischen Bestimmung des Farbstoffes entnommen. Die gefundenen Zahlen wurden graphisch ausgewertet.

Dabei ergab sich die überaus interessante Tatsache, daß noch 3 Std. nach dem Beginn des Einleitens des Farbstoffes die Konzentration des Farbstoffes an den günstigsten Stellen mehr als 20mal so groß war als an den ungünstigsten. Die Unterschiede zwischen in verschiedenen Tiefen entnommenen Proben waren außerordentlich beträchtlich. Wenn selbstverständlich auch der Einwand berechtigt ist, daß im Badebetrieb doch günstigere Verhältnisse vorliegen, weil der Beckeninhalt ständig durch die Bewegung der Schwimmer gemischt wird, so möchte ich dieser Tatsache nur eine relative Bedeutung beimessen. Der Färbeversuch hat uns auch das Verständnis für die Tatsache, von deren Zutreffen wir uns oft überzeugen mußten, vermittelt, daß die Bestimmung der Keimzahl im Beckenabfluß keinen Querschnitt durch die Verhältnisse im Becken liefert.

Wenn wir die Gewinnung einer mittleren Keimzahl anstreben, müssen wir an möglichst zahlreichen Stellen des Beckens und auch aus verschiedenen Tiefen entnehmen. Dabei müssen dann aber auch die Entnahmestellen so über das Becken verteilt sein, daß jeder von ihnen eine gleichgroße Wassermenge entspricht. Würde man beispielsweise die Fläche des Beckens in zwei gleichgroße Hälften teilen und jeweils im Schnittpunkt der beiden Diagonalen dieser Fläche je eine Probe entnehmen und hieraus das Mittel ziehen, so wäre dieses Vorgehen falsch. Im Nichtschwimmerabteil, in dem auf die Flächeneinheit eine viel kleinere Wassermenge trifft, als an den tiefen Stellen des Schwimmerabteiles, sind die Verhältnisse für die Wasserverbesserung durch das zufließende aufbereitete Wasser viel günstiger als an den tiefen Stellen des Beckens. Wir würden bei dem Vorgehen in der beschriebenen Weise daher eine viel zu niedrige mittlere Keimzahl vorgetäuscht erhalten. Die Senkrechte, die die Wassermenge einer von uns untersuchten Schwimmhalle in zwei gleich große Anteile unterteilt, liegt beispielsweise 19,4 m von der Beckenquerkante der Nichtschwimmerseite und nur 10,6 m von der Beckenquerkante der Schwimmerseite entfernt.

Wir halten es für nötig, mindestens 6 Entnahmestellen vorzusehen, davon je 3 an jeder Längsseite des Beckens einander entsprechend angeordnet.

1) Die Veröffentlichung der Aufnahmen erfolgt an anderer Stelle. (Arch. f. Hyg., Bd. 122, 1939).

Jede Entnahmestelle liefert dann den Mittelwert für $^1/_6$ der gesamten Wassermenge. Die Festlegung der Entnahmestellen ist ein kleines rechnerisches Problem, das man ohne Zuhilfenahme einer Integralrechnung durch eine einfache graphische Darstellung lösen kann.

Man trägt auf der Abszisse eines Ordinatensystemes die Abstände von der Querkante der Nichtschwimmerseite einiger zur Querwand des Beckens parallel angenommener Ebenen auf und berechnet jeweils die zwischen ihnen und der Querkante der Nichtschwimmerseite eingeschlossenen Wassermengen, die man als Ordinaten einträgt. Die ermittelten Punkte verbindet man durch eine Kurve. Nunmehr kann man in bekannter Weise mit Hilfe dieser Darstellung die Lage der Ebenen auffinden, die einen bestimmten Bruchteil der gesamten Wassermenge des Beckens, also beispielsweise $^1/_6$, $^3/_6$ und $^5/_6$ abgrenzen und damit auch die gesuchten Entnahmestellen festlegen.

An den 6 Entnahmestellen sollte man nach Möglichkeit je eine Probe oben und unten entnehmen. Der Einfachheit halber kann man sich dabei wohl mit der Entnahme der einen Probe dicht unter der Wasseroberfläche und der anderen Probe dicht über dem Beckenboden begnügen. Für die Entnahme in der Tiefe benötigt man ein besonderes Entnahmegefäß, das man in der Tiefe öffnen und schließen kann. Es sind verschiedene mehr oder weniger zweckmäßige Konstruktionen solcher Entnahmegefäße bekannt. Ich möchte Ihnen bei dieser Gelegenheit ein Gefäß zeigen, das ich mir für diesen Zweck durch die Firma Stiefenhofer in München, Karlsplatz 6, habe herstellen lassen und das sich gut bewährt hat. Ich gebe Ihnen das Gefäß, das durch die Herstellerfirma käuflich bezogen werden kann, herum. Der Wirkungsmechanismus ist wohl ohne weiteres einleuchtend[1]). Natürlich kann man die Entnahme auch anders machen. Wenn man eine Mischprobe aus den verschiedenen Tiefen entnehmen will, kann man auch solche Entnahmegefäße verwenden, die, ohne einen besonderen Verschluß zu benötigen, ein nur allmähliches Eindringen des Wassers zulassen, wie beispielsweise die von Olszewsky angegebene Probeflasche.

Außer diesen 2×6 Proben aus dem Becken sollte man immer auch noch eine Probe aus dem Beckenzufluß entnehmen.

Eine Entnahme aus dem Filterablauf ist überflüssig, da die Aufgabe des Filters nicht die einer Beeinflussung der Keimzahl ist.

Die nächste Frage ist die: Wann soll entnommen werden? Entsprechend unserer oben aufgestellten Forderung der Entnahme unter ungünstigsten Verhältnissen: am Spättage während des Hochbetriebes. Untersuchungen vor Betriebseröffnung erscheinen uns wenig aufschlußreich. Bei der Gelegenheit möchte ich aber darauf hinweisen, daß die Besucherzahl des Vortages sich nach unseren Erfahrungen ebenso häufig eindeutig auf die Wasserqualität auswirkt wie die Besucherzahl des Entnahmetages.

Was ist nun bei der Weiterverarbeitung der entnommenen Proben zu beachten? Die Forderung der Verhinderung einer Nachwirkung des Chlors im Nährboden ist nicht neu. Spitta hat erst kürzlich wieder darauf hingewiesen, daß man sie auch dann nicht unbeachtet lassen sollte, wenn man der Ueberzeugung ist, daß bei den in Frage kommenden kleinen Chlormengen die Gefahr eines Nachwirkens im Nährboden nicht groß ist. Meines Erachtens trifft die Fragestellung in dieser Form nicht den Kern der Sache. Die Entchlorung ist aus ganz anderen Gründen zum mindesten unentbehrlich. Hierzu

1) Die Beschreibung dieses Entnahmegefäßes erfolgt ausführlich mit derjenigen auch anderer Gefäße für die Entnahme von Wasserproben aus der Tiefe zum Zwecke bakteriologischer Untersuchung in Band 122 (1939) des Archiv für Hygiene.

muß ich kurz auf die Absterbekurve bei der Einwirkung eines Desinfektionsmittels auf eine Bakteriensuspension eingehen. Diese Absterbekurve verdanken wir Madsen und Nymann. Reichenbach hat die Verhältnisse 1922 auf der 9. Tagung dieser Gesellschaft in Würzburg auf Grund der zahlenmäßigen Unterlagen von Madsen und Nymann übersichtlich vorgetragen. Ich zeige Ihnen, um an diese Verhältnisse zu erinnern, eine damals von ihm vorgewiesene kurvenmäßige Darstellung. Die Kurve gibt die Darstellung der Absterbekurve, wie sie von Reichenbach und anderen als gültig angenommen wird. Der Kurvenzug entspricht der Zahl der jeweils noch vorhandenen unabgetöteten Bakterien. Er fällt zunächst steil ab, um dann schließlich nahezu parallel zur x-Achse umzubiegen. Natürlich handelt es sich hierbei um eine Exponentialkurve: Die Zahl der Absterbenden ist zu jeder Zeit der Menge der Ueberlebenden proportional. Die Zahl der Absterbenden in der Zeiteinheit wird durch die Rechtecke dargestellt. Sie ist im Anfang groß und wird dann kleiner und kleiner. (Die Kurve ist abgebildet im Zbl. Bakter. I Orig., Bd. 89, S. 16*, 1923.)

Je mehr wir uns bei der Entnahme einer Probe nun noch in dem Steilabfall der Absterbekurve befinden, um so mehr ist die sofortige Aufhebung der Weiterwirkung des Desinfektionsmittels in der entnommenen Probe unbedingt unerläßlich. Um hier einige Zahlen zu nennen, möchte ich folgendes anführen: 1,1 lmg Chlor tötet, wie wir in entsprechenden Versuchen sahen, in weniger als 40 Sek. alle Keime restlos ab, 0,35 lmg vermindern dagegen bei einer Einwirkungszeit von 40 Sek. die Keimzahl nur ganz unbeträchtlich, bei einer Einwirkungszeit von Stunden aber enorm. Die Einwirkung der vollen Chlorkonzentration erstreckt sich bei den praktisch bisher in Hallenschwimmbädern verwirklichten Verhältnissen aber immer nur auf wenige Sekunden; bei dem von uns untersuchten Bad beispielsweise belief sich diese Zeit auf ca. 13 Sek. Wir konnten sie unter Aufwendung nicht unbeträchtlicher technischer Mittel, auf die ich hier nicht näher eingehen kann, für unsere Versuchszwecke auf 40 Sek. etwa erhöhen. Wie jeder Untersucher weiß, der Schwimmbäder zu beurteilen hatte, ist der im Wasser gefundene Chlorgehalt häufig schon ganz kurz nach Einlaufen des chlorierten Wassers in das Becken wieder sehr niedrig. Eine Nachwirkung der großen Chlormenge durch eine eventuelle Adsorption an den Bakterien erscheint uns ganz unwahrscheinlich, da zum mindesten der wesentliche Anteil der Chlorwirkung auf der Oxydation beruht. Der Einwand, wir seien zu einer Aufhebung der Weiterwirkung wegen solchen adsorbierten Chlors nicht berechtigt, erscheint daher nicht stichhaltig.

Ganz klar liegen diese Verhältnisse übrigens für die aus dem Becken entnommenen Proben. Sobald Keime aus dem Schwimmbecken von einem Badenden aufgenommen werden, können sie zum mindesten beim zufälligen Vorliegen einer Achylie bei diesem unter günstigste Entwicklungsbedingungen kommen. Um festzustellen, ob eine solche Gefährdung besteht, müssen wir die in der entnommenen Probe eventuell noch lebens- und entwicklungsfähigen Keime sofort nach der Entnahme der Probe in Nachahmung dieser Verhältnisse in günstigste Entwicklungsbedingungen bringen.

Auch bei der Beurteilung von Silberungsverfahren erscheint uns eine sofortige Aufhebung der Silberwirkung unerläßlich. Diese ist beispielsweise durch einen Zusatz von Natriumsulfid zu der entnommenen Probe möglich.

Wir sind bei unseren Entnahmen so vorgegangen, daß wir die Proben direkt in einer Flasche entnommen haben, die schon das Entchlorungs- bzw. Entsilberungsmittel in ausreichender Menge enthielt. Bei der Entnahme von 150 ccm Wasser etwa sind 0,5 ccm n/100 Thiosulfatlösung zur Aufhebung der

Chlorwirkung ausreichend. Während wir bei gut überwachtem Chlorierungsverfahren bei Entnahme von Proben aus dem Becken bei sofortiger Aufhebung der Chlorwirkung in der beschriebenen Weise Bact. coli auch in 100 ccm nur ganz selten fanden, fanden wir bei der Ueberprüfung des Elektrokatadynverfahrens mit sofortiger Entsilberung Bacterium coli in der Regel in 100 ccm, manchmal auch in 10 ccm.

Jetzt nur noch einige Worte über die Weiterbehandlung der Proben. Es ist erstaunlich, wie häufig die Forderung von Remy, die Platten vor der Zählung eine ausreichend lange Zeit zu bebrüten, außer acht gelassen wird. Auch Bürgers hat auf diesem Kongreß bereits zweimal darauf hingewiesen, daß im allgemeinen in der Bakteriologie die Platten viel zu kurze Zeit beobachtet werden. Wir konnten uns eindringlichst davon überzeugen, daß es ohne Zweifel richtig ist, die Ablesung der bei 22° bebrüteten Platten keineswegs vor dem 8. Tage abzuschließen. Nur als Beispiel, welche Fehler gemacht werden, möchte ich anführen, daß ein großes Institut bei einer vor allem in Badefachkreisen stark beachteten erst kürzlich veröffentlichten Untersuchung, wie uns bekannt ist, nach 2 Tagen zählte.

Gelatine als Nährboden erscheint wegen der Gefahr der Verflüssigung vor dem 8. Tage wenig zweckmäßig. Wir schlagen die Verwendung von Agar und gegebenenfalls dazu Kiebo vor.

Ueber die richtige Bebrütungstemperatur kann man diskutieren. Da ja ständig die Untersuchung auf Coli parallel läuft, halten wir 22° für die geeignetste Temperatur.

Da die Herstellung von Verdünnungen einer größeren Anzahl Proben technisch eine Mehrbelastung darstellt, schlagen wir vor, immer jeweils 0,1 ccm zu einer Platte direkt zu verarbeiten.

Die Zählung sollte, um auch hier bessere Vergleichsmöglichkeiten zu bieten, einheitlich mit einer schwachen Vergrößerung (vielleicht etwa 30fach) im Zählokular vorgenommen werden. Jede Platte sollte doppelt angelegt werden.

Ich fasse also zusammen:

1. Entnahme an 6 Stellen im Becken oben und unten. Das ergibt 12 Proben. Hierzu kommt eine 13. Probe aus dem Beckenzufluß. Auffangen bzw. Entnahme der Proben direkt im Entchlorungsmittel (0,5 ccm n/100 Thiosulfatlösung auf 150 ccm) oder gegebenenfalls im Entsilberungsmittel (Natriumsulfid).

2. Entnahmezeit: Am Spättage während des Hochbetriebes.

3. Verarbeitung: Von jeder Probe 0,1 ccm auf je 2 Agar- und 2 Kieboplatten verarbeiten. Bebrütung bei 22°. Colititer in 100 ccm, Colizahl in 10 und 1 ccm. Ablesung der Platten nach 8 Tagen. Zählung mit Zählokular bei etwa 30facher Vergrößerung.

Nun noch ein paar Worte über die zur Beurteilung unbedingt erforderlichen Angaben. Ich fasse mich kurz.

1. Ort woher die Probe stammt. Untersuchungsergebnisse der einzelnen Proben angeben. Die Angabe der Mittelwerte allein erscheint aus oben ausgeführten Gründen nicht ausreichend.

2. Entnahmezeit.

3. Besucherzahl am Untersuchungstage und am Vortage.

4. Genaue Angaben über die Chlorierung. Besonders im Hinblick auf die interessanten Untersuchungen von Nachtigall und Ali, die vier verschiedene Wassertypen auf Grund des zeitlichen Verlaufs des Chlorschwundes unterscheiden, sollte der gefundene Chlorwert von allen Entnahmestellen angegeben werden. Bei einer mehrmaligen Untersuchung gewinnt man hierdurch auch Anhaltspunkte, wie zuverlässig die Chlorierung durchgeführt wird. Findet man die Zugabe ausreichend, im Becken aber gegen seine Erwartung im Gegensatz zu früheren Untersuchungen insbesondere in der Nähe des Ablaufes nur ganz niedrige Chlorwerte oder überhaupt kein freies Chlor, so kann man überzeugt sein, daß der Werkmeister die Chlorzugabe nicht genügend zuverlässig einreguliert.

Selbstverständlich ist schließlich, daß man

5. den Gesamtinhalt des Beckens und die zeitliche Dauer und Größe der Umwälzung angeben sollte.

45. W. Bachmann (Kiel):

Ueber den Keimgehalt und sonstige Beschaffenheit von künstlich aus dem Meere durch Seewasserverdampfer gewonnenem Trinkwasser [1]).

In einer Arbeit von B. Hylkema (Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg., Bd. 38, S. 183, 1934), wo auch die zugehörige ältere Literatur zusammengestellt ist, wird über Mängel der Trinkwasserversorgung von Handelsschiffen zumal in den Tropen berichtet mit der Feststellung, daß Bedenken gegen in Schiffstanks (in doppeltem Boden) gespeichertes Wasser bestehen, das höchstens einer groben Filterung unterzogen wird, dessen Herkunft oft unzuverlässig ist und das auch beim Laden übermäßige Verunreinigungen, die im übrigen vermeidbar sind, erleiden kann. Trotz der in solchen Tanks sich abspielenden Selbstreinigungsvorgänge (Nachwuchs von Bakterien und Protozoenvermehrung) sind die von untauglichem Tankwasser ausgehenden Gefahren zumindest in den ersten Tagen noch vorhanden. Wegen dieser hygienischen Unzulänglichkeiten wird vom Verfasser Sterilisation des mitgeführten Trinkwassers durch Erhitzen gefordert. Wird dies aber als notwendig anerkannt, so liegt der Vorteil auf der Hand, der darin besteht, wenn sich Schiffe von der Uebernahme eines Frischwasservorrates unabhängig machen und statt dessen ihren Frischwasserbedarf aus Seewasserverdampfern decken, wie sie seit langer Zeit bekannt (Literatur bei R. Blaum, Schiffsbautechnische Gesellschaft, 37. Hauptversamml Berlin, 18.—21. 11. 1936), heute in moderner Form für Dampf- und Motorschiffe ausgebildet worden sind (z. B. Atlas-Werke Bremen) und über deren technische Grundlagen von anderer Seite berichtet worden ist (s. R. Blaum). Nur so viel sei hier erwähnt, daß eine derartige Anlage ganz auf Beheizung mit niedrig gespanntem Dampf eingestellt ist, wobei, da nicht immer Abdampf verfügbar ist, mit gedrosseltem Frischdampf

1) Aus dem Hygienischen Institut der Universität Kiel (Direktor: Professor Dr. med. Werner Bachmann).

geheizt werden muß (0,45 kg Heizdampfverbrauch pro 1 l Destillat). Für Trinkzwecke wird das Destillat noch mit von außenbord angesaugter Luft belüftet und durch Aktivkohlefilter geschickt, wo anhaftende Gerüche zurückgehalten werden und eine gewisse Salzanreicherung erfolgt.

Tabelle I.

Art der Untersuchung	am 21. 1. 38	am 17. 3. 38	am 26. 1. 39
pH	6,5	6,3	6,8
Abdampfrückstand	22,4 mg/l	27,2 mg/l	8,0 mg/l
Glühverlust	10,4 mg/l	8,8 mg/l	4,0 mg/l
Gesamthärte	2,2 d. H.°	1,4 d. H.°	fast 0 d. H.°
Bleibende Härte	0,8 d. H.°	0,6 d. H.°	—
Freie CO_2	0 mg/l	18,4 mg/l	7,5 mg/l
Aggressive CO_2	0 mg/l	30,0 mg/l	7,5 mg/l
$KMnO_4$-Verbrauch	2,2 mg/l	2,8 mg/l	3,2 mg/l
Cl	8,0 mg/l	8,0 mg/l	8,0 mg/l
Ammoniak	0 mg/l	0 mg/l	Spur
Eisen	0 mg/l	weniger als 0,02 mg/l	0,4 mg/l
Mangan	0 mg/l	0 mg/l	0 mg/l
Keimzahl im ccm	21	0	—
Colititer	0 in 100 ccm	0 in 100 ccm	

Eine in Tabelle I gegebene Zusammenstellung der chemischen und bakteriologischen Beschaffenheit von drei Wasserproben, die aus einer Versuchsanlage in Bremen bzw. aus der Anlage eines von der Reise zurückgekehrten Motorschiffes stammen, zeigt, daß bis auf aggressive Eigenschaften des Wassers und den in einer Probe zu hohen Eisengehalt (durch Wiedervereisenung entstanden) keine hygienischen Einwendungen gemacht zu werden brauchen, auch nicht in bakteriologischer Hinsicht, da das Wasser sich als praktisch keimfrei erwiesen hat. Die Einwendung, daß solches aus Seewasserverdampfern gewonnenes Trinkwasser deshalb gesundheitsschädlich sei, weil es zu weich ist, kann mit dem Bemerken widerlegt werden, daß nach unseren Feststellungen etwa 40 Städte in Deutschland ein Trinkwasser von geringerer Härte an die Bevölkerung abgeben als der Probe aus dem Seewasserverdampfer vom 21. 1. 1938 entspricht, ohne daß man jemals bei den Einwohnern dieser Städte von Gesundheitsschädigungen gehört hat, die mit dem zu weichen Trinkwasser in sicheren ursächlichen Zusammenhang gebracht werden konnten.

46. Heinrich Reichel (Graz):

Beobachtungen und Forschungen an den Wiener Hochquellen [1]).

Die Stadt Wien ist bekanntlich in der glücklichen und seltenen Lage als Großstadt eine Quellwasserversorgung zu besitzen, die wenigstens in der Hauptsache auch den an eine solche vom Hygieniker zu stellenden Anforderungen entspricht. Dies bedeutet aber nicht einen sorgenfreien Zustand, der, etwa einmal hergestellt, keiner weiteren Bemühungen bedürfte, sondern

1) Aus den Hygienischen Instituten der Universitäten Wien und Graz.

seine Aufrechterhaltung verlangt vielmehr bedeutende Vorsorgen und Maßnahmen, deren Erforderlichkeit auch nicht von vornherein selbstverständlich war, sondern die teils gegen Unverständnis und Mißdeutungen, teils gegen große private Interessen erkämpft werden mußten.

Die gesetzliche Sicherstellung ausreichender Quellschutzmaßnahmen, die Wien heute besitzt, geht erst auf wenig mehr als ein Jahrzehnt zurück. Es war im Jahre 1925, daß ein großer Angriff auf das Quellgebiet in dem Sinne unternommen wurde, die Hochfläche der Raxalpe dem Fremdenverkehr weit mehr als bisher zu erschließen, indem nicht nur eine Seilbahn dorthin erbaut, sondern auch eine Autostraße, ein Fluglandeplatz, Wintersporteinrichtungen für internationale Veranstaltungen und selbstverständlich auch eine entsprechende Anzahl von Hotelbauten errichtet werden sollten.

Da es sich in diesem wie im ganzen Gebiete um ein — auch noch teilweise kahles — Kalkgebirge handelt, ist der Reinheitszustand des dortigen Quellwassers naturgemäß nur durch die weitgehende Unberührtheit des Geländes: Verkehrsarmut und fast völliges Freisein von menschlichen Siedelungen gewährleistet. Schon der allmählich immer stärker werdende Touristenverkehr im Quellgebiete mußte Bedenken erregen und Vorkehrungen herausfordern, um wieviel mehr eine Erschließung für den breiten Menschenstrom des internationalen Fremdenverkehrs! In dem von Seite der Hygieniker geführten, damals zunächst durch Prof. Graßberger eingeleiteten Kampfe um die Reinheit der Quellwässer ist es vorgekommen, daß ein sonst hervorragend verdienter Amtsarzt des Ruhestandes aus Tirol in einer viel gelesenen Wiener Tageszeitung darlegte, es sei an sich undenkbar, daß schädliche Bakterien, wenn sie auch in das Quellwasser hineingelangen sollten können, sich auf dem langen Wege nach Wien — d. h. durch 16 Std. — bei der Temperatur von 10° C am Leben erhalten könnten. Durch solche und ähnliche Aeußerungen von scheinbar fachmännischer Seite verwirrt, wurden die zur Wahrung des öffentlichen Interesses berufenen Männer vielfach schwankend, was zu tun sei, und es war nicht leicht, die volle Durchführung der Pläne noch zu verhindern, zumal der erste Schritt: die Bewilligung der Raxseilbahn, ohne Anhörung irgendwelcher Sachverständiger voreilig getan worden war.

Im Frühjahr 1927 wurde mir von der Quellschutzkommission die Aufgabe gestellt zu untersuchen: 1. ob denn wirklich der Keimgehalt des Wiener Wassers aus dem Hochquellgebiete stammt und 2. ob der Keimgehalt der Quellen von der Bodenoberfläche herkommt. Diese durch die öffentliche Diskussion ausgelöste Fragestellung war bei genauerer Betrachtung doch nicht so überflüssig, als es dem Fachhygieniker zunächst scheinen mochte. Es galt ja nicht bloß auch den gebildeten Laien vom Zutreffen beider Tatsachen zu überzeugen, sondern auch bei dieser Gelegenheit zu ermitteln, wie es sich damit des genaueren verhielt. Es war ja immer möglich, daß neben der zweifellosen Herkunft der Wiener Keimzahlen aus den Quellen doch auch, vielleicht wenigstens fallweise, eine Verunreinigung am Wege vorkam. Solchen kurzdauernden und seltenen Ereignissen konnte nur im Rahmen einer täglichen, zum Teil täglich mehrfachen Beobachtung durch Monate mit Aussicht auf Erfolg nachgegangen werden. Für die Verhältnisse im Quellgebiete selbst war bis dahin der zeitliche Verlauf der durch die Schneeschmelze und durch sommerliche Regengüsse verursachten Verunreinigungen auch nicht genauer bekannt, und ihre Erforschung im Zusammenhang mit einer verdichteten meteorologischen Beobachtung im ganzen Gebiete mußte großem Interesse begegnen.

Endlich war die Aufgabe besonders reizvoll, für alle solche neuartigen Feststellungen die rechnerische Methodik auszuarbeiten.

Es wurde mir damals möglich gemacht durch sechs Monate einen Assistenten mit einem behelfsmäßig eingerichteten Laboratorium im Quellgebiete der ersten Hochquelleitung ständig zu halten und auch selbst häufig dort anwesend zu sein. Die Arbeiten in Wien wurden zugleich von der durch mich geleiteten Abteilung des Hygienischen Institutes und von dem unter Viktor Gegenbauer stehenden Laboratorium der Gemeinde durchgeführt, mit dem auch der Plan und die Ergebnisse dieser ganzen Arbeiten ständig erörtert und der Bericht an die Quellschutzkommission einvernehmlich abgegeben wurde. Gegenbauer hat dann auch im Jahre 1933 die hauptsächlichsten Ergebnisse dieser gemeinsam geführten Untersuchungen veröffentlicht (Jahrbuch „Vom Wasser", Bd. VII, Chemie-Verlag, Berlin), die ja in der Tat den von uns von vornherein aufgestellten Vermutungen in der Hauptsache entsprochen hatten. Die vielen interessanten Einzelheiten dieser Untersuchungen sind aber bisher noch unveröffentlicht, und wenn ich auch manches davon im folgenden vorbringen will, so ist es doch auch schon in Anbetracht der kurzen mir zur Verfügung stehenden Zeit nicht meine Absicht, darauf heute näher einzugehen und auch nicht das Hauptgewicht meiner Ausführungen darauf zu legen. Dieses soll vielmehr auf dem Hinweise auf gewisse mathematisch-statistische Methoden liegen, mittels derer die Ergebnisse gewonnen wurden und mit denen sie, wie ich glaube, allein in so knapper und bestimmter Form zu gewinnen waren.

Ich kann mich aber auch mit diesen methodologischen Betrachtungen verhältnismäßig kurz fassen, weil ich Gelegenheit hatte, das Wesentliche der Methoden, losgelöst vom Anlaß der Quelluntersuchungen, aber doch auch unter Heranziehung von Beispielen aus diesen zu veröffentlichen (Abderhaldens Handbuch, Abt. V, Teil 10, S. 986), worauf hier verwiesen sei.

Das zahlenmäßige Ausgangsmaterial unserer Betrachtungen bestand einerseits aus Keimzählungen, Colizählungen nach dem Verfahren von Krombholz (Arch. f. Hyg., Bd. 84, S. 151; Bd. 85, S. 117), Leitfähigkeitsbestimmungen und Temperaturmessungen von rund 1800 Wasserproben, andererseits den Ergebnissen täglicher Messungen der Lufttemperaturen und der Regenhöhen an vier Stellen des Quellgebietes und Ergiebigkeitsmessungen an den Quellen selbst. Es soll hier hauptsächlich nur von den Keimzählungen in ihrer Beziehung untereinander und zu den meteorologischen und hydrologischen Daten die Rede sein.

Diese Werte waren einerseits am Anfang und am Ende des rund 100 km langen Aquäduktes der ersten Wiener Hochquelleitung, dessen Durchströmungszeit 16 Std. beträgt, alltäglich gewonnen, andererseits an den 10 einzelnen Quellen dieses Gebietes, und zwar an den zwei größten zweimal täglich, an den kleineren, die auch vom Laboratorium entfernter lagen, zweimal wöchentlich.

Der Sommer des Jahres 1927 war im ganzen warm und ziemlich trocken, hatte aber auch einzelne besonders heftige Niederschläge aufzuweisen, was beides für unsere Untersuchungsergebnisse günstig war. Die Keimzahlen verhielten sich demgemäß im Durchschnitt eher niedriger als nach früheren Befunden zu erwarten war, unterlagen aber gelegentlich sehr bedeutenden Schwankungen.

Was zunächst die Beschaffenheit des in Wien eintreffenden Wassers in ihrer Beziehung zu der des im Quellgebiete wegfließenden anlangt, so war zwar schon aus der arithmetisch gestuften graphischen Darstellung der beiden Wertreihen ihre Aehnlichkeit, in vielen Fällen ihre auffällige Uebereinstimmung und damit der Beweis des Zusammenhanges der Erscheinungen zu ent-

nehmen. Doch war erst das Ausmaß dieser Beziehung quantitativ zu bestimmen.

Hier ergab sich, wie ja auch sonst in solchen Fällen der Kollektivmaßlehre, die es mit Werten zu tun haben, welche im Verhältnis zur Größe ihres Mittels stark schwanken, die Notwendigkeit, sowohl die Mittelung der Werte als auch die Korrelationsrechnung zwischen beiden Reihen, nach dem schon von Gustav Theodor Fechner (Kollektivmaßlehre 1897) aufgestellten Grundsatze nicht arithmetisch, sondern geometrisch, d. h. mit den Logarithmen der Beobachtungswerte durchzuführen, wodurch allein die anderenfalls unförmliche Streuung der Einzelwerte um das Mittel die übliche Form der Gaußschen Fehlerkurve annimmt. Ich hatte schon bei früheren Gelegenheiten (Arch. f. Rassenbiol., Bd. 30, S. 186) für die Angabe solcher geometrisch berechneter Streuungen in Analogie zu dem üblichen Zeichen $\pm$ das neue ⋇ (sprich: mal oder durch) eingeführt, welche Bezeichnung dann auch mehrfach in der Technik Anklang gefunden hat und eingeführt wurde (H. Graßberger, Die Wasserwirtschaft, 1936, H. 9, 10).

Die so berechneten Mittel und Streuungen der Keimzahlen verhalten sich nun beim Wegfließen im Quellgebiete und bei der Ankunft in Wien sehr ähnlich: 38,0 ⋇ 2,64 und 36,1 ⋇ 2,60; der Fehler des Mittelwertes ist in beiden Fällen ⋇ 1,08.

Wichtiger für den Beweis eines Zusammenhanges als dieser Vergleich der Mittelwerte muß selbstverständlich der Vergleich im einzelnen sein, der am besten durch die Korrelationsrechnung zwischen beiden Reihen zu erbringen ist. Auch diese Rechnung läßt sich in solchen Fällen von relativ großer Variation mit der geometrisch-logarithmischen Methode leichter und befriedigender durchführen als bei arithmetrischer Fassung der Ergebnisse, wobei, wie die Abbildung Figur 448, S. 1068 der zitierten Abhandlung (Abderhaldens Handbuch, Abt. V, T. 10) für eben diesen Fall zeigt, die Form des Schwarmes der Einzelwerte im Korrelationsfeld fast als unzulässig, jedenfalls als stark fehlerhaft erscheinen würde, während er bei geometrischer Rechnung, und zwar mit der Basis 2 (Fig. 449, S. 1070) die übliche Gestalt eines deutlich gerichteten Schwarmes annimmt. Ja selbst die allzu grobe Rechnung in Dekaden (Fig. 450, S. 1071), bei der das Resultat aus mehreren Hundert Beobachtungen in wenigen Minuten angeschrieben werden kann — unser Zahlensystem gibt ja die Werte schon dekadisch! —, ergibt Mittelwerte, Streuungen und Korrelationskoeffizienten, die im Vergleich mit den zweifellos wertvolleren Ergebnissen bei der Rechnung im Zweiersystem ebenfalls schon als recht leidlich genau erscheinen.

Es sei bei dieser Gelegenheit besonders betont, daß alle von mir hier und in anderen Zusammenhängen unseres Faches vorgeschlagenen geometrisch-logarithmischen Kollektivrechnungen weit rascher und auch für den mathematisch Ungebildeten leichter zu erledigen sind, als die gleichen Aufgaben nach den üblichen Methoden der mathematischen Statistik. Die Lehrbücher dieser Wissenschaft zitieren alle irgendwo Fechner, um zu sagen: man sollte eigentlich, wie er bewiesen habe, geometrisch rechnen; durchgeführt wird dies aber nur in wenigen Fällen.

Es ergibt sich so ein Korrelationskoeffizient von $0{,}65 \pm 0{,}05$, also eine recht große und außerordentlich sichere Korrelation beider Wertreihen.

Worauf beruht aber nun die vielleicht zunächst überraschend erscheinende Tatsache, daß dieser Zusammenhang zwischen den beiden Wasserbefunden draußen und drinnen nicht noch größer, vielleicht nahe bei 1,00, ist? Eine einfache Ueberlegung lehrt, daß der Keimgehalt des in Wien eintreffenden Wassers nicht bloß von dem des 16 Std. früher im Quellgebiete

abströmenden abhängen kann, sondern auch von dem des Vortages, dann auch des Vorvortages usw. in gewissem Ausmaße abhängen muß, und zwar einfach deshalb, weil sich das Wasser im Aquädukt nicht wie ein starrer Stab verschiebt, sondern beim Strömen sich mit Rücklässen der Vortage vermischen muß.

Die als „Mischkorrelation“ zu bezeichnende Größe kann der Reihe nach für die einzelnen Tage berechnet und der fallende Gang dieser Größe kann unschwer als eine Exponentialkurve aufgefaßt werden, wobei die Größe des Abfalles, wie dies zuerst im Falle der radioaktiven Stoffe geschehen ist, am anschaulichsten als „Halbwertzeit“ angegeben wird, d. h. als jene Zeit, binnen deren ein Ausgangswert auf seine Hälfte absinkt. So sinkt unsere Mischkorrelation in etwa 5 Tagen auf die Hälfte des Wertes, wie er bei den zeitlich zusammengehörigen Proben auftritt.

Neben diesem Begriffe der Mischkorrelation muß aber nun noch ein zweiter ähnlicher in Rechnung gezogen werden: die „Eigenkorrelation“ einer Wasserspende, worunter die Beziehung zu verstehen ist, die zwischen dem gegenwärtigen Keimgehalt und dem der vorausgegangenen Tage überhaupt besteht. Daß eine solche vorliegt, beruht einfach darauf, daß die Bedingungen, welche eine erhöhte Keimzahl hervorrufen, meist nicht von Tag zu Tag wechseln, sondern als wesentlich meteorologische und hydrologische Gegebenheiten oft für eine längere Zeit gleichartig vorliegen, oder doch auf Tage nachwirken. Ob dies in höherem oder geringerem Maße der Fall ist, dürfte ein nicht unwichtiges Merkmal jeder Wasserspende bedeuten, das aus einer größeren Reihe von fortlaufenden Beobachtungen immer gut errechenbar sein dürfte, d. h. für ein und dieselbe Wasserspende auch immer ähnlich herauskommen wird. Wir dürfen also in dieser Maßzahl vielleicht wirklich eine wertvolle Bereicherung unserer Begriffe in der Wasserbakteriologie erblicken.

Als Ausgangswert der Eigenkorrelation ist die Korrelation der — ja immer genommenen — Parallelproben anzusetzen, welchen Wert man auch als „Genauigkeitskorrelation“ bezeichnen könnte und der hier $0{,}93 \pm 0{,}008$ beträgt. In unserem Falle ergibt sich für die Eigenkorrelation eine Halbwertzeit von 3,6 Tagen. Es liegt demnach so, daß die Keimzahl des Wassers in Wien z. B. von der 8 Tage zurückliegenden Keimzahl im Quellgebiet deutlich mehr abhängt als von der ebenfalls 8 Tage zurückliegenden eigenen Zahl. Gerade diese Differenz des Kurvenverlaufes der beiden Korrelationsgänge beweist erst die Tatsache des Mischungseinflusses.

Es wäre von großem Interesse, die analogen Verhältnisse für die Colizahl in 100 ccm zu verfolgen, wobei naturgemäß noch weit größere Schwankungsbreiten der Befunde auftreten. Manches scheint aber hier für eine Vermehrung der Colizahl in der Aquäduktstrecke zu sprechen, die gewiß nicht durch eine echte Keimvermehrung erklärt werden kann. Wenn sie also zu Recht besteht, worüber neue Forschungen Aufschluß geben müßten, so bleibt nur anzunehmen, daß entweder während des Fließens Verbände von Colikeimen zerrissen werden, oder daß neue solche Keime durch die Fugen des Aquäduktes einzudringen vermögen. Diesbezüglich wäre ein Vergleich mit der zweiten Hochquelleitung von Interesse, die anstatt eines Aquäduktes auf lange Strecken geschlossene Rohrleitungen aufweist.

Für die Annahme, daß eine Einschwemmung von Keimen doch fallweise als besonderes Ereignis bei der ersten Hochquelleitung vorkommt, sprechen einzelne Keimzahlbefunde, die an solchen Tagen erhoben werden konnten, wo auf der Aquäduktstrecke, nicht aber im Quellgebiet selbst Wolkenbrüche geherrscht hatten. Die besprochenen Korrelationstafeln zeigen zwei solche aus dem übrigen Schwarm herausfallende Punkte.

Bedeutsamer vielleicht, jedenfalls mannigfaltiger als diese Vergleiche zwischen dem Wasser im Quellgebiet und in Wien sind die für die Quellen selbst erhobenen Befunde.

Was zunächst die Keimzahlwerte an den einzelnen Quellen anlangt, so verhalten sich diese nur bei der Hauptquelle: dem Kaiserbrunnen, denen des Sammelwassers weitgehend ähnlich und noch etwas höher, die aller anderen Quellen niedriger, z. B. jedoch stärker schwankend. Eine dieser Quellen fällt auch durch einen besonders hohen durchschnittlichen Coliwert auf. Im Gang der Eigenkorrelation, d. h. also in der Nachhaltigkeit einer einmal gesetzten Verunreinigung, unterscheiden sich die einzelnen Quellen offenbar stark; leider war diese Berechnung nur für die täglich untersuchten Hauptquellen genauer durchführbar. Die Halbwertzeichen scheinen sich zwischen 3 und 6 Tagen zu bewegen. Für eine von den Quellen mußte bei mäßiger Durchschnittskeimzahl wegen besonders starken Schwankens dieses Wertes und zugleich besonders trägen Korrelationsganges der Vorschlag einer temporären Ausschaltung bei Eintritt von Regenperioden gemacht werden.

Der jahreszeitliche Gang der Keimzahlen weist bei allen Quellen einen schroffen Anstieg mit der Schneeschmelze, dann ein allmähliches Wiederabsinken und später während des Sommers und Herbstes einen häufigen und wechselnd hohen Anstieg im Zusammenhang mit Regengüssen auf. Eine Erscheinung war von besonderem Interesse: während die Ergiebigkeit der Quellen schon wenige Stunden nach den Regengüssen im Einzugsgebiet stark ansteigt, beginnt der zugehörige Anstieg der Keimzahl erst nach 2—3 Tagen. In dieser Tatsache darf ein Beweis gegen die Annahme erblickt werden, daß es vielleicht bloß Mängel der Quellfassungen seien, die Niederschlagswasser aus der nächsten Umgebung in die Quellstube eindringen lassen. In diesem Falle müßten sich die einzelnen Quellen verschieden verhalten, was eben nicht der Fall ist. Ferner sprechen diese Befunde gegen die mehrfach vorgebrachte Vorstellung, die höhere Keimzahl stamme in der Hauptsache nicht von der Bodenfläche, sondern daher, daß nach dem Regen durch die höheren Wasserstände in den Felsspalten bisher bloß feuchte und besonders keimreiche Zonen bespült würden, von wo sich dann eine Fülle harmloser Wasserkeime ablösen und in die Quellen gelangen sollte. In diesem Falle müßten die Quellen offenbar sofort keimreich werden. Daß der Wasserstand nach unseren Befunden tatsächlich schon Tage früher hoch ist, bevor unreines Wasser durchkommt, beweist also eindeutig, daß diese Verunreinigung von der Bodenoberfläche herrührt. Es strömt eben offenbar irgendwo unreines Tagwasser in eine Kluft, hebt dadurch überall — die Klüfte verhalten sich ja wie kommunizierende Röhren — den Wasserstand, erreicht aber erst nach Tagen, je nach der Entfernung der Einstromstelle von der Quellfassung, die Quelle.

Mehrfach konnten an einzelnen Quellen auch Beobachtungen gemacht werden, daß die Ergiebigkeit auf Regengüsse in den vermeintlichen Einzugsgebieten nicht anstieg, so daß diese eben offenbar irrigerweise als solche angenommen worden waren. In diesen Fällen blieb aber auch die Keimzahlerhöhung aus. In einem besonders wichtigen Falle führte ein Wolkenbruch in einem frisch gegen die Wildbachgefahr verbauten Tale nicht zu einer Ergiebigkeitssteigerung und auch nicht zu einer Keimzahlvermehrung in der dort gelegenen Quelle, die früher oft schwer verunreinigt worden war. Hier hatte also die Untersuchung den Nutzen dieser kostspieligen Verbauungsarbeiten eindeutig erwiesen. Es ist wohl klar, daß solche und andere Feststellungen nur bei fortlaufender Beobachtung der Quellen zu gewinnen sind,

da es ja dabei darauf ankommt, unerwartete Ereignisse mit Befunden zusammenzuhalten, die nur wenige Stunden später erhoben sind.

Auch diese Ergebnisse konnten nicht bloß aus den laufenden Protokollen der Untersuchungsreihen schon leidlich abgelesen werden, sondern sie waren dann auch statistisch einwandfrei zu erfassen. Es war dazu allerdings auch wieder notwendig, methodisch neue Wege zu gehen. Eine bloße Korrelation zwischen Niederschlägen oder Ergiebigkeiten einerseits und Keimzahlen andererseits konnte keine Klarheit bringen, weil jene Größen einen starken jahreszeitlichen Gang aufweisen.

Es ist auf zwei Wegen gelungen, die Tatsachen zu erfassen. Einmal wurde es unternommen, was wieder nur im logarithmischen Maßstab möglich war, einen durchschnittlichen Jahresgang ihrer Größen festzulegen und dann die Abweichungen davon zu korrelieren. Daraus ergibt sich dann die genannte enge Beziehung zwischen der Keimzahl und der Ergiebigkeitssteigerung vor 2—3 Tagen. Einfacher und freier von willkürlichen Ansätzen ist die zweite Methode, die ebenfalls zum Ziel führte: Man kann das Ausmaß der Steigerung der Ergiebigkeit von einem Tag zum anderen in Korrelation bringen mit der Keimzahl an den darauffolgenden Tagen.

Auch hier ergaben sich viele interessante Einzelheiten, auf die in diesem Rahmen nicht näher eingegangen werden kann. Besonders verhält sich die Schneeschmelzperiode und die Zeit der sommerlichen Regengüsse etwas verschieden: die Verunreinigung klingt in der ersteren Periode rascher wieder ab als in der letzteren.

Als Hauptergebnis unserer Untersuchungen konnte also gefolgert werden:

1) Die Verunreinigungen des Wassers der ersten Wiener Hochquelleitung stammen tatsächlich, mindestens in der weitüberwiegenden Menge, aus den Quellen.

2) Die Verunreinigungen der Quellen stammen von der Bodenoberfläche. Es fehlt also dem Boden, mindestens stellenweise, die erforderliche Filtrationskraft und er muß deshalb unbedingt so rein als irgend möglich erhalten werden.

3) Die großen Quellen erscheinen als Abflüsse eines weiträumigen und zusammenhängenden Spaltensystems, so daß an jeder Stelle des ganzen Einzugsgebietes, auch entfernt von den Quellfassungen, Verunreinigungen einzudringen vermögen. Es bedarf also eines umfassenden gesetzlichen Quellschutzes im ganzen Gebiete.

In methodischer Hinsicht kann wohl aus den Untersuchungen gefolgert werden, daß die ständige Beobachtung an Ort und Stelle wertvolle Aufschlüsse, und zwar nicht bloß in wissenschaftlicher Hinsicht, sondern auch in wirtschaftlich sehr bedeutsamen Fragen zu bringen vermag.

Endlich darf wohl gesagt werden, daß die an diesen Untersuchungsbefunden entwickelten mathematisch-statistischen Methoden und Begriffe sowohl für eine überblickende Betrachtung der Tatsachen, als auch für die Feststellung oder Ablehnung gesuchter Zusammenhänge sich als nützlich erwiesen haben und auch für andere ähnliche Fälle empfohlen werden können.

Aussprache.

E. Gildemeister (Berlin):

Herr Kruse führte aus, daß die Typhusepidemie in Hannover im Jahre 1926, die eine Wasserepidemie war, auf das Versagen der Chlorung zurückzufuhren sei. Das ist nicht richtig. Die Chlorung an sich hat nicht versagt, sondern die Menschen, die dieses Verfahren zu überwachen hatten. Es gibt kein Verfahren, das ohne sorgfältige dauernde Kontrolle verläßlich arbeitet.

M. Eugling (Hygienisches Institut der Universität Wien):

Ich habe mich zu dem Sammelbericht des Herrn Beger über die Mikrobiologie des Süßwassers zum Wort gemeldet. Da Herr Beger Hydrobiologe ist, wollte ich nur kurz darüber sprechen, wie der Hygieniker die biologische Wasseruntersuchung verwendet. Er beurteilt erstens die einzelnen tierischen und pflanzlichen Organismen nach ihren Lebensansprüchen und Lebensgewohnheiten und unterscheidet dabei Organismen, welche nur in reinem Wasser vorkommen, solche welche nur im Schmutzwasser vorkommen und solche, welche eine Mittelstufe einnehmen. Die Einteilung von Kolkwitz und Marson in 3 Gruppen, in Poly-, Meso- und Oligosaprobien ist bekannt, den Hygieniker interessieren hauptsächlich die Polysaprobien, die sich durch große Gefräßigkeit auszeichnen und nur im Schmutzwasser leben, zweitens will er nicht nur ihre Anwesenheit feststellen, sondern er will vor allem auch die Zahl der aus 100 oder 1000 Liter Wasser abfiltrierbaren Organismen ermitteln.

Da sich die Polysaprobien, wenn sie in reines Wasser gelangen, auch dort erstaunlich lange halten können, so ist es sehr wichtig zu wissen, woher diese Verunreinigung stammt und wie dieselbe behoben werden kann. Um das zu erfahren, müssen wir auch noch andere Methoden der Wasseruntersuchung zu Rate ziehen. Wir können uns nur dadurch einen vollkommenen Einblick in die Beschaffenheit des Wassers verschaffen, wenn wir mit der biologischen Untersuchung auch gleichzeitig eine chemische und bakteriologische Untersuchung mit Keimzahl und Colititer durchführen. Ich habe diese Forderung schon vor 15 Jahren erhoben und ich freue mich, daß Stundl vom Hygienischen Institut in Gelsenkirchen in dem letzten Hefte der Naturwissenschaften die gleiche Ansicht zum Ausdruck bringt. Wenn wir die biologische Untersuchung in Kombination mit der chemischen und bakteriologischen Untersuchung durchführen, dann ist sie allerdings imstande, uns wertvolle Aufschlüsse zu geben und uns Dinge zu verraten, deren Aufklärung nur schwer möglich gewesen wäre.

Die biologische Untersuchung wird in der Regel mit dem Planktonnetz und dem Kolkwitzschen Kupfersieb durchgeführt. Sowohl der Seidenstoff des Planktonnetzes als auch das Kupfersieb sind Wunderwerke deutscher Technik. Aber trotz der Engmaschigkeit dieser Netze wäre es vollkommen ausgeschlossen, daß die Organismen durch reine Siebwirkung auf dem Netze zurückgehalten werden können. Nicht nur das Zwergplankton, sondern auch viel größere Organismen aus dem Protozoenreich würden das Sieb passieren, und zwar weil die Maschenweite etwa 50—70 μ beträgt und weil außerdem das Plasma der Protozoen so weich ist, daß es durch die Maschen des Netzes durchgedrückt wird, wobei es seine Gestalt weitgehend verändern kann. Auch Herr Beger war sich dieser Tatsache bewußt und hat daher den einseitigen Druck auf die Wandungen des Planktonnetzes dadurch verringert, daß er das Planktonnetz gleichzeitig mit einem Wassereimer an die Wasserleitung angehängt hat. Die Ausbeute von Organismen wird auf diese Weise sicher größer, aber der Einarbeitungsprozeß auf dieser großen Filterfläche dauert trotzdem sehr lange.

Wenn man ein Planktonnetz oder ein Kupfersieb unter dem Mikroskop anschaut und in die Maschen des Netzes ein Wasser mit Euglena viridis hineingibt, so genügt schon die Bestrahlung mit der Lampe, daß die spindelförmigen Euglenen mit 40—50 μ Länge eine kugelförmige Gestalt mit nur 10—15 μ Durchmesser annehmen. Es können daher auch so große Organismen, wie Euglena viridis nur nach entsprechender Einarbeitung auf dem Planktonnetz zurückgehalten werden. Wenn die Organismen in den Maschen des Netzes drinnen sind, so gelingt ihre vollständige Entfernung meist nur im Laboratorium.

Ich habe daher für die biologische Untersuchung ein Flaschenfilter angegeben, welches eine viel kleinere Filterfläche besitzt als das Planktonnetz, die sich rasch einarbeitet und welche gestattet, die ganze Filterfläche mit den darauf befindlichen Organismen herauszuheben und in ein kleines Pulvergläschen zu übertragen, so daß man auf diese Weise das Filtrat von etlichen hundert Litern Wasser bequem mit nach Hause nehmen und der Untersuchung zuführen kann. Nach einer gründlichen Spülung kann die Filterflasche mit einer neu eingeführten Filterfläche sofort wieder benützt werden. Es kann aber auch die Filterfläche dem zu erwartenden Grade der Verunreinigung angepaßt werden, man kann eine dünne oder eine dicke Watteschicht, man kann ein einfaches, 3- oder 5faches Planktonnetz verwenden. Auch die Wassermenge, welche man durch ein solches Filter filtrieren kann,

ist ein guter Maßstab für die im Wasser enthaltenen Suspensa. Wichtig ist nur, daß das Wasser möglichst gleichmäßig das Filter passiert und daß man ein Ausgleichsgefäß verwendet, wenn das Wasser gepumpt wird.

Ich habe durch viele Jahre mit diesem Filter Untersuchungen am Wiener Hochquellwasser vorgenommen und fortlaufend das Ergebnis der Filtration mit der chemischen und bakteriologischen Untersuchung verglichen. Bei diesem reinen Gebirgswasser, das aus dem Rax- und Schneeberggebiet einerseits und aus dem Hochschwabgebiet andererseits stammt und in mehr als 100 km langen Leitungen nach Wien gebracht wird, sehen wir bei der chemischen Analyse zur Zeit der Schneeschmelze nur eine ganz minimale Erhöhung der Oxydierbarkeit. Bei der bakteriologischen Untersuchung finden wir beim plötzlichen Auftreten von warmem Wetter eine plötzliche Erhöhung der Keimzahl und des Colititers. Aber ebenso wird die Zahl der mikroskopisch kleinen Würmer und Krebse, die aus 1000 Litern abfiltriert werden können, entsprechend erhöht. Die Zahl der Keime, die sich aus 1 ccm Wasser in 48 Std. bei 22° C entwickeln, zeigt in ihren Schwankungen eine sehr deutliche Uebereinstimmung mit der Gesamtzahl der Organismen in 1000 Liter Wasser. Auch die Pollenkörner der Fichten, die im Frühling im Wasser zu finden sind, zeigen in der Häufigkeit ihres Auftretens in 1000 Liter Wasser einen sehr deutlichen Parallelismus mit den Schwankungen der Keimzahl. Im Verlaufe von 3 Jahren konnte ich mehr als 50 verschiedene tierische und pflanzliche Organismen in dem Hochquellwasser feststellen. Der Nachweis dieser Organismen zeigt nun sehr deutlich, daß das Kalkgebirge mit seinen Klüften und Spalten nicht immer eine ausreichende Filtration gewährleistet und daher einen ausreichenden Quellschutz benötigt. Ich habe Ihnen diese weiter zurückliegenden Untersuchungen gezeigt, damit Sie daraus ersehen, daß auch bei fortlaufender Untersuchung einer Wasserspende die biologische Untersuchung sehr gut verwendet werden kann.

Besonders wertvolle Dienste leistet die biologische Untersuchung bei der einmaligen Untersuchung von Brunnen, wie sie in der jetzigen Zeit für die Heime der Jugendorganisationen, des Arbeitsdienstes und Militärs von vielen Hygienikern durchgeführt werden müssen. Ich möchte allen Kollegen raten, diese einfache Methode der biologischen Wasseruntersuchung in Verwendung zu ziehen, sie werden damit nur Freude erleben.

A. Schinzel (Wien):

Seit dem Jahre 1873 wird Wien durch Wasser aus Hochquellen versorgt; es handelt sich um typische Kalkalpenquellen; diese führen neben gut filtriertem auch mangelhaft filtriertes Wasser. Zur sorgfältigen Ueberwachung des Wiener Trinkwassers war eine genaue Kenntnis der Gefahren und der gefährdeten Quellen nötig. Dabei haben sich gewisse Zusammenhänge zwischen den bakteriologischen und chemisch-physikalischen Befunden und den Ergiebigkeitsmessungen einerseits und den meteorologischen Verhältnissen in den einzelnen Quellgebieten anderseits ergeben, die alle zur einwandfreien Beurteilung unerläßlich sind. Im großen und ganzen kann gesagt werden, daß die Quellen am ehesten gefährdet sind, die die größten Ergiebigkeitsschwankungen, insbesondere nach großen Regengüssen, aufweisen. Dieselben Quellen zeigen auch größere Schwankungen in der Härte und in der Mehrzahl auch die niedrigsten Härtegrade. (Kürzere Verweildauer im Boden?)

Es stellte sich heraus, daß die angeführten Tatsachen insbesondere mit zwei Gefahrenmomenten in Zusammenhang stehen: Auf den Hochflächen versickert das Wasser im allgemeinen, daneben findet es aber an zahlreichen Stellen noch Gelegenheit, am Boden von Rundtälern (Dolinen) durch Klüfte im Fels direkt dem Grundwasser zuzuströmen. Immerhin legt das Wasser noch bis zur Quellfassung eine Höhe von oft weit über 1000 m zurück, was die von Reichel festgestellte Tatsache verständlich macht, daß die Keimzahl durch plötzliche Regengüsse erst nach 2 Tagen beeinflußt wird.

Ein zweites ebenso wichtiges Gefahrenmoment stellen die tiefen glazialen Taleinschnitte dar, durch welche die gleichmäßigen Abhänge breit unterbrochen werden. Hier sind es weniger die mit Schutt (Geschiebe, Moränen) bedeckten Talböden, als vielmehr die seitlichen und vorderen Umrandungen, wo Wasser auf raschem Wege den Quellen zufließen kann. Gerade die größeren Quellen entspringen am Boden solcher Täler, und es hat sich gezeigt, daß lokale Gewitter tatsächlich oft schon nach ½—¾ Std. zu einer starken Ergiebigkeitssteigerung und Trübung führen. An den steilen Felshängen klettern allerdings nur wenige Menschen und die Hütten am Rande der Täler sind sämtlich beseitigt; daher ist die Gefahr gering. Im übrigen wurden in allen diesen Fällen an den Hängen und auf den Hochflächen die Wege aus den möglicherweise gefährdeten Gebieten verlegt und bei den Hütten für eine einwandfreie Abwasserbeseitigung Sorge getragen.

Die beiden erstgenannten Umstände erklären, warum beim Hochquellenwasser mit einem gewissen Gehalt an Keimen und Kleinlebewesen zu rechnen ist und warum zur Zeit der Schneeschmelze und nach Regengüssen ihre Anzahl stärker ansteigt. Es sei aber erwähnt, daß die Zahl der Gärungserreger zur Zeit der Schneeschmelze in der Regel unverändert bleibt, hingegen nach Sommerregen und Gewittern meist ausgiebig mit ansteigt.

Ein dritter Umstand, der eine Gefahr für die Quellwässer darstellt, sind Zuflüsse von Oberflächenwässern im Bereiche der Täler, oft in größerem Abstand von der Quellfassung selbst. Die näheren Quelleinzugsgebiete sind nunmehr im Besitze der Stadt Wien und als Quellschutzgebiete abgesperrt. Es gab aber noch genügend Möglichkeit von Zuflüssen aus oberflächlichen Gewässern, die zum Teil nur bei größeren Wasserständen bemerkbar wurden, zum Teil Bächlein waren, die nach kurzem Lauf wieder versiegten, wieder erschienen und verschwanden usf. Hier wurden zum Teil erst in letzter Zeit umfangreiche Absperrmaßnahmen getroffen und durch weitgehende wasserundurchlässige Bachbettverbauungen Wässer, die einmal zutage getreten waren, am Wiederversickern und dadurch am Zufluß zum Quellwasser verhindert. Während auf die weicheren und in ihrer Ergiebigkeit stärker schwankenden Quellen schon immer ein wachsames Auge geworfen wurde, hat es sich gezeigt daß gerade auch härtere Quellen durch zum Teil ganz geringe Zuflüsse von Oberflächengewässern viel mehr gefährdet waren, ohne daß dies an den Befunden bei der üblichen Methodik zu erkennen gewesen wäre.

Gegenüber diesen 3 Gruppen von gefährdenden Umständen waren kostspielige Absperrungsmaßnahmen, Bachverbauungen und Fassungen und teilweise auch zeitweise Ausschaltungen von Quellen notwendig. Die entscheidenden Schritte in dieser Hinsicht konnten allerdings erst in den letzten Jahren durch die Erwerbung der betreffenden Gründe seitens der Stadt Wien erfolgen.

Aegli Michaelides (Cypern z. Z. Berlin):

Für die hygienische Beurteilung eines Trinkwassers sind neben den chemischen Untersuchungsbefunden in erster Linie die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung von Bedeutung. Zu diesem Zwecke dient die Keimzahl und der Befund bestimmter Keime, die im Darm von Tier und Mensch vorkommen, aber widerstandsfähiger und leichter nachweisbar sind als die Krankheitserreger, also in erster Linie des Bact. coli. Der Befund von Bact. coli beweist im allgemeinen, daß das Wasser mit den Abgängen von Tier oder Menschen verunreinigt ist. Nun stellt das Bact. coli allerdings keine einheitliche Art dar, und es sind die Ansichten darüber, was als Bact. coli anzusehen ist, noch heute sehr geteilt. Das Bact. coli findet sich am massenhaftesten im Dickdarm des Menschen und der Tiere, und zwar sowohl der warmblütigen wie der kaltblütigen. Es findet sich aber auch in entsprechend geringer Zahl außerhalb des Körpers von Mensch und Tier in der freien Natur. Naturgemäß überall dort, wo Boden und Wasser mit Fäkalien in Berührung gekommen sind, teils aber auch in ähnlichen Formen im Boden, an Pflanzen usw. Die Frage ist also jedesmal offen, ob die gefundenen Formen mit den Abgängen von Mensch und Tier dorthin verschleppt sind, oder ob es sich dabei um Bakterien sui generis oder um umgewandelte Formen des Bact. coli handelt.

Im folgenden soll daher als Beispiel für die Schwierigkeit der Differenzierung in der Coligruppe und für die Unmöglichkeit, zu einem eindeutigen Ergebnis zu gelangen, ein Befund geschildert werden, den wir bei der fortlaufenden bakteriologischen Kontrolle eines Wasserwerkes lange Zeit hindurch erhoben haben und dessen Deutung für die Beurteilung des Wassers von großer Wichtigkeit war.

Im Hygienischen Institut der Universität Berlin wird das Rohwasser von 3 Wasserwerken fortlaufend monatlich einmal bakteriologisch untersucht. Bei der Gärungsprobe wiesen die Gärröhrchen der einen Wasserprobe stets Gas auf. Die Gasbildung trat gewöhnlich erst nach 48stünd. Bebrütung bei 37° auf. Der Verdacht auf Coli war also gegeben, wenn man auch aus der etwas spät eintretenden Gärung entnehmen konnte, daß es sich nur um wenig Keime handeln konnte, wofür ja auch die geringe Keimzahl des Rohwassers sprach. Nach 72 Std. war die Gasbildung außerordentlich stark, so daß aus dem geschlossenen Schenkel des Gärkolbens die Flüssigkeit fast ganz ausgetrieben war. Die aeroben Aussaaten auf Endoagar, die angelegt wurden, nachdem die Gasbildung eingetreten war, ergaben jedoch keine Coli- oder coliähnlichen Kolonien, sondern lediglich flache trockene Kolonien von grampositiven Sporenbildnern, die in Reinkultur in Traubenzuckerbouillon kein Gas bildeten.

Die Aussaaten aus den Gärkolben waren bisher dann vorgenommen worden, wenn die Gärung und Gasbildung nach 48—72 Std. den Höhepunkt erreicht hatte. Es war daher möglich, daß der eigentliche Gärungserreger während dieser Zeit von anderen Keimen überwuchert wurde, oder daß die Säuerung so weit vorgeschritten war, daß der Gärungserreger durch die von ihm selbst und anderen Keimen gebildete Säure eine Schädigung erfuhr. Wir legten daher bereits nach 18—24 Std. Aussaaten aus dem Gärkolben auf Endoagar und gewöhnlichem Agar an und erhielten ein ganz anderes Resultat. Die bisher aufgetretenen Kolonien von grampositiven Stäbchen waren gar nicht oder nur vereinzelt vorhanden, dagegen entwickelte sich eine mäßige Zahl von runden, saftigen, coliartigen Kolonien, die auf Endoagar dort, wo sie einzeln standen, farblos, bei dichterer Aussaat leicht rötlich gefärbt waren. Diese Kolonien bestanden aus gramnegativen, kurzen, durchaus wie Colibakterien

aussehenden Stäbchen. Reinkulturen dieses Stäbchens wurden in Gärkolben mit Traubenzuckerbouillon und sterilem Leitungswasser (an Stelle des Rohwassers) gebracht, es entwickelte sich dieselbe starke Gärung und Gasbildung wie in den Rohwasserproben. Wir hatten also zweifellos den gesuchten Gärungserreger vor uns.

Es war nun zu untersuchen, ob das gefundene Bakterium als Bact. coli anzusprechen war. Wie bereits oben ausgeführt, stellt der Begriff „Bact. coli" durchaus nichts Einheitliches dar. Wir haben es vielmehr mit einer Sammelbezeichnung zu tun, deren Grenzen von den verschiedenen Autoren verschieden weit gezogen werden. Während das Bact. coli commune durch bestimmte Eigenschaften wohl charakterisiert ist, finden sich andere Keime, die in manchen Eigenschaften sich mit dem ersteren decken, in anderen dagegen von ihm abweichen. Man hat die letzteren unter dem Begriff Bact. coli imperfectum oder Bact. paracoli zusammengefaßt, ohne daß diese Gruppe wieder unter sich etwas Einheitliches darstellt.

In der medizinischen Bakteriologie versteht man unter Paracolibakterien gewöhnlich Stäbchen, die in den meisten Eigenschaften mit dem Bact. coli commune übereinstimmen, denen aber die Fähigkeit der Milchzuckervergärung oder der Indolbildung aus Peptonen mangelt. Im Darm mancher Tiere aber und in der freien Natur gibt es wiederum gramnegative Stäbchen, die die eine oder beide der eben genannten Eigenschaften besitzen, denen dagegen wieder andere für das Bact. coli commune charakteristische fehlen. Es bleibt also nicht selten der Auffassung des betreffenden Untersuchers überlassen, ob er ein gefundenes Bakterium noch als Coli ansprechen will.

Während in der amerikanischen Literatur, in den Standard Methods of Water Analysis, empfohlen wird, auf gewöhnlichen Nährböden wachsende, gramnegative, nichtsporenbildende Mikroorganismen, welche Milchzucker unter Gas- und Säurebildung zersetzen, als der Coligruppe angehörig zu betrachten, ziehen die meisten deutschen Autoren, besonders auch die Preußische Landesanstalt für Wasser-, Boden- und Lufthygiene (Bürger) die Grenzen erheblich enger.

Der von uns aus dem Rohwasser gezüchtete Stamm, den wir mit Stamm Th. bezeichnen wollen, verhielt sich folgendermaßen:

Morphologie: Kurzes, etwa plumpes Stäbchen. Im hängenden Tropfen: schwach- bis unbeweglich (Molekularbewegung?) Geißeln (Färbung nach Peppler und nach Zettnow) nicht nachweisbar. Keine Sporen.

Gramfärbung: negativ.

Wachstum: auf Traubenzuckeragar ziemlich große, saftige undurchsichtige, runde Kolonien, auf Blutagar: keine Hämolyse, auf Kartoffelnährböden: weißer Belag, in Bouillon: gleichmäßige Trübung, auf Gelatine und Gelatinestich: keine Verflüssigung, auf erstarrtem Pferdeserum: keine Verflüssigung.

Chemische Leistungen: Schüttelkultur in Traubenzuckeragar: starke Gasbildung, Traubenzuckerneutralrot: starke Gasbildung, keine Entfärbung, keine Fluoreszenz, Traubenzuckerbouillon: starke Gasbildung, Milch: keine Gerinnung, Lackmusmolke: Rötung, Endoagar: farblos, bei dichter Aussaat leicht gerötet. Langescher polytroper Nährboden (Milchzucker und Mannit mit Lackmuslösung und Neutralrot):

	Stamm Th.	Bact. coli
nach 24 Std.:	rötlichgelb, keine Gasbildung,	gelb, Gasbildung,
nach 48 Std.:	rötlichgelb, keine Gasbildung,	rötlichgelb, Gasbildung,
nach 72 Std.:	gelb, keine Gasbildung.	rot, Gasbildung.

Indolbildung (in Trypsinbouillon) negativ.

Verhalten verschiedenen Temperaturen gegenüber:

Auf Traubenzuckeragar:	a) bei 22° nach 48 Std.	gutes Wachstum
	b) „ 37° „ 48 „	„ „
	c) „ 46° „ 48 „	kein Wachstum.
Eijkmannsche Probe:	(bei 46°): negativ.	

Pathogenität: bei subkutaner und intraperitonealer Infektion im Mäuse- und Meerschweinchenversuch nicht pathogen.

Eine serologische Differenzierung ist wegen der mangelnden Einheitlichkeit der Coligruppe nicht anwendbar. Trotzdem wurde versucht, mit einem mit dem Stamm Th. vom Kaninchen gewonnenen agglutinierenden Serum unter verschiedenen Paracolistämmen vielleicht serologisch verwandte Typen aufzufinden. Zu diesem Zwecke wurden aus zahlreichen Stuhlproben von Menschen diejenigen Stämme isoliert, die auf Endoagar farblos wuchsen, eine negative Indolreaktion und eine positive Methylrotreaktion (s. unten) gaben. Sämtliche Agglutinationsversuche dieser Stämme mit dem vom Stamm Th. gewonnenen Serum fielen negativ aus, desgleichen mit einem aus Eis isolierten coliähnlichen Stamm.

Außer den bisher angeführten zur Differenzierung benutzten Eigenschaften kommen nun noch einige hinzu, die das Bact. coli vom Bact. lactis aerogenes trennen.

Wir untersuchten nun das Verhalten des Stammes Th. drei weiteren Reaktionen gegenüber, um es vom Bact. lactis aerogenes abgrenzen zu können. Herr Prof. Pesch, dem dafür an dieser Stelle vielmals gedankt sei, prüfte das Wachstum des Stammes Th. auf dem von ihm hergestellten Ammoniumchlorid-Zitratagar und seinen übrigen synthetischen Nährböden zur Differenzierung der Coli-aerogenes-Gruppe. Der Befund war folgender:

	Stamm Th.	Coli
Ammonchlorid-Traubenzuckeragar	+	+
Ammonchlorid-Zitratagar	+	—
Ammonchlorid-Rhamnoseagar	—	+

Die Voges-Proskauersche Reaktion fiel bei unserem Th-Stamm negativ aus. In einem Pepton-Traubenzucker-Phosphatnährboden gab Stamm Th. eine positive Methylrotreaktion.

Fassen wir nun die Ergebnisse der Untersuchung des Stammes Th. zusammen und vergleichen wir seine Eigenschaften mit denen des Bact. coli, so ergeben sich eine Reihe von Uebereinstimmungen: Die Form der Stäbchen, die schwache Beweglichkeit, die Gramnegativität, die Form der Kolonien, die Traubenzuckervergärung, das Fehlen der Gelatineverflüssigung, die negative Voges-Proskauersche Reaktion und die positive Methylrotreaktion. Nicht unbedingt gegen Coli würde die geringe Milchzuckervergärung bzw. das Fehlen der Milchgerinnung oder die mangelnde Indolbildung sprechen, denn, wie oben bereits ausgeführt, treffen die eine oder die andere dieser Eigenschaften auch für die als Bact. coli imperfectum oder Bact. paracoli bezeichneten Abarten zu. Das gleiche gilt für das Fehlen der Entfärbung des Neutralrotagars unter Fluoreszenzerscheinung, die auch nicht bei allen Colistämmen konstant ist. Immerhin dürfte der Ausfall aller dieser Eigenschaften die Zurechnung des Stammes Th. zur Coligruppe als wenig berechtigt erscheinen lassen.

Gegen Coli spricht in erster Linie das Verhalten auf den synthetischen Nährböden nach Pesch: der Stamm Th. wächst auf Zitratagar, dagegen nicht auf Rhamnoseagar, Coli verhält sich umgekehrt. Gegen Warmblüter-Coli spricht fernerhin das fehlende Wachstum bei 46° C (Eijkmansche Probe). Auch der Ausfall der Mannitvergärung im Nährboden von L. Lange, sowie die Apathogenität bei intraperitonealer Injektion im Mäuseversuch läßt sich mit einer Zugehörigkeit zur Coligruppe schlecht in Einklang bringen.

Eine Zurechnung zur Aerogenesgruppe kommt wegen des gerade entgegengesetzten Verhaltens in der Milchgerinnung, der Voges-Proskauerschen Reaktion und der Methylrotreaktion nicht in Frage.

Bringt man die voneinander abweichenden Eigenschaften unseres Stammes Th. und des Bact. coli tabellarisch zur Darstellung, so ergibt sich folgendes Bild:

	Stamm Th.	Coli
Polytroper Nährboden nach L. Lange	negativ	positiv
Neutralrotagar	keine Entfärbung keine Fluoreszenz	Entfärbung Fluoreszenz
Milchgerinnung	negativ	positiv
Indolbildung	negativ	positiv
Mannitvergärung	negativ	positiv
Eijkmansche Probe	negativ	positiv
Wachstum auf		
Ammonchlorid-Rhamnoseagar . .	negativ	positiv
Ammonchlorid-Zitratagar	positiv	negativ
Pathogenität (Mäuse intraperitoneal) .	negativ	positiv

Da so viele Abweichungen von den Eigenschaften des normalen Bact. coli vorliegen, ist es unseres Erachtens nicht möglich, den Stamm Th. als zur Coligruppe gehörig zu betrachten. Damit fällt auch der Verdacht, daß das Rohwasser einen unerwünschten Zufluß erhält, der mit dem Darminhalt von Menschen oder Tieren verunreinigt ist, fort. Um welches Bakterium es sich bei dem Stamm Th. handelt, wird sich kaum feststellen lassen. Ihn einer der bekannten Bakteriengruppen einzuordnen, ist nicht möglich. Hier kam es uns nur auf die Erörterung der Colidiagnose bei der Wasseruntersuchung an. Für diese soll der vorliegende Befund einen Beitrag liefern, an dem gezeigt wird, daß eine Colidiagnose nach der Empfehlung der Standard methods of Water Analyses und der Gewohnheit mancher Untersucher, sich nur mit der Gärprobe zu begnügen, nicht genügt und zu Fehlschlüssen in der Beurteilung des Bakteriums und damit des Wassers führt.

Die Bedeutung dieser Befunde ist deswegen wichtig, weil es durch die nicht vollkommene Untersuchung möglich wäre, ein Wasser als ungeeignet für den Genuß zu erklären, welches in Wirklichkeit nicht verunreinigt ist und das durch seine chemischen Bestandteile nicht nur geeignet, sondern auch besonders wichtig für die Gesundheit ist, wie es mit den Heilquellenwässern der Fall ist.

M. Gundel (Gelsenkirchen):

Es muß entschieden gegen einige Ausführungen des Herrn Geheimrat Kruse Stellung genommen werden, sofern sie Probleme der Chlorung des Trinkwassers und auch des Badewassers betreffen. Zunächst muß bei der Behandlung dieser Fragen streng zwischen der Chlorung von Trink- und der Chlorung von Badewasser unterschieden werden.

Die Chlorung wird von uns durchaus nur als ein Notbehelf angesehen. Unmöglich wird sie als eine Ideallösung anerkannt, sondern stets als ein „notwendiges Uebel". Es ist uns aber insbesondere im Ruhrgebiet unmöglich, von der Chlorung abzugehen, da man bei diesen Wasservorkommen ohne eine Behandlung des Wassers nicht auskommen kann, da die gesundheitliche Gefährdung der Bevölkerung sonst viel zu groß wäre und wir mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit mit dem Auftreten von Epidemien zu rechnen haben.

Hinsichtlich der von Kruse aufgeführten Schäden der Chlorung ist folgendes in Kürze zu erwidern:

1. Bei einwandfreier Bedienung der Anlagen riecht und schmeckt gechlortes Wasser nicht nach Chlor. Auch die Chlorbelästigungen bei der Benutzung von Hallenschwimmbädern können auf ein Minimum heruntergedrückt werden, sofern diese Anstalten unter dauernder hygienischer Ueberwachung stehen und insbesondere die Behandlungsverfahren einwandfrei arbeiten.

2. Mit den modernen Apparaturen ist die Dosierung der Chlorung nicht mehr schwierig. Das gilt nur nicht für die völlig veralteten Anlagen, die durch die modernen zu ersetzen sind. Auf den Wasserwerken ist die richtige Dosierung durch ständige Kontrollen sicherzustellen. Auch gibt es bereits automatische Anzeiger. Auf den Wasserwerken ist dafür Sorge zu tragen, daß die Chlorung so eingerichtet wird, daß ein ständiger Chlorüberschuß nachweisbar ist. Die Stärke des Chlorüberschusses wird örtlich verschieden sein und richtet sich nach der Beschaffenheit des Wassers und insbesondere nach dem Chlorbindungsvermögen. Im Ruhrgebiet verlangen wir einen Chlorüberschuß von 0,1 mg/l, der sicherlich anderenorts niedriger sein kann.

3. Die Chlorung dient als Dauerchlorung der Epidemiebekämpfung! Die Erfolge sind insbesondere im Ruhrgebiet unbestritten.

4. In Hannover hat nicht die Chlorung versagt, weil sie zu gering dosiert war, sondern es lag ein Versagen des Wasserwerks vor. Die Wasserwerke sind, wie im Ruhrgebiet, der Ueberwachung des Hygienikers zu unterstellen, und der Hygieniker hat dafür Sorge zu tragen, daß ständig seinen berechtigten Anforderungen entsprochen wird. Dies bezieht sich nicht nur auf die Chlorung.

5. Die Nachteile der Chlorung, wie sie gelegentlich und in einzelnen Gebieten bei Eintritt der Frostperiode oder durch das Auftreten von Chlorphenolen zu verzeichnen sind, werden von dem Hygieniker nicht verheimlicht. Im Gegenteil wird man solche Ereignisse stets dazu benutzen, um die Ueberwachung immer weiter zu verbessern und auszubauen und um notwendige Sanierungsmaßnahmen sowie Verbesserungen zur Durchführung zu bringen. Für uns gilt wenigstens das Gesetz, das wir jedes ungünstige Untersuchungsergebnis oder jedes hygienisch bedenkliche Ereignis als Beweismaterial dazu benutzen, um die von uns als notwendig erkannten Maßnahmen beschleunigt zur Ausführung bringen zu lassen. Man denke hierbei an die Bekämpfung der Flußverunreinigung, Bau neuer Kläranlagen, neue Aufbereitungsanlagen, Rückgewinnungsanlagen von Eisenbeizereiabwässern, Entphenolungsanlagen, Talsperren usw.

6. Keimgehalt und Colivorkommen bei der Beurteilung der Badewässer sind u. E. nicht bedeutungslos, sondern wichtig. Wir vertreten auch im Gegensatz zu Kruse die Auffassung, daß eine Benutzung von Badewasser über 4—6 Monate wie in Leipzig durchaus abgelehnt werden muß, da der Hygieniker nicht nur bakteriologischen und chemischen Feststellungen Rechnung trägt, sondern besonders auch ästhetischen Gesichtspunkten. Bei einwandfreier Bedienung der Anlagen, täglicher Wassererneuerung von etwa 10—20 Proz. läßt sich ein hygienisch durchaus einwandfreies Badewasser garantieren.

7. Eine Dauerchlorung von Trinkwasser kommt sowohl auf großen als auch in kleineren Wasserwerken nur dann in Betracht, wenn eine ständige und hauptamtliche Ueberwachung durch besonders ausgebildetes Personal sichergestellt ist und wenn ferner diese Chlorungsanlagen auch der ständigen Kontrolle des Hygienikers bei seinen unangemeldeten Besuchen unterstehen.

8. Die Chlorung ist zur Sicherung einer hygienisch einwandfreien Trinkwasserversorgung solange die Methode der Wahl, als kein besseres Verfahren an ihre Stelle gesetzt werden kann. Von der Versilberung haben wir bisher nicht den Eindruck, daß dieses Verfahren an die Stelle der Chlorung treten könnte.

Wo. Olszewski (Hosterwitz-Pillnitz b. Dresden):

Bereits Lemmel[1]) machte darauf aufmerksam, daß die Gelatinekeimzahl eines Badewassers keine Grundlage für seine Beurteilung bilden sollte. Ich glaube, daß diese Feststellung wohl allgemein Anerkennung gefunden hat. Von den allgemeinen übrigen bakteriologischen Wasserprüfungsverfahren bleibt somit die wichtigste Prüfung auf Bacterium coli und die Feststellung der Agarkeimzahl. Die Agarkeimzahl wird allgemein festgestellt nach 24stünd. Bebrütung bei 37°. Geheimrat Kruse will eine 48stünd. Bebrütung bei 27°, Dr. Anton sogar eine 8tägige Bebrütung bei 22° ausführen. Die Bestrebungen, die Bebrütungsdauer solange wie irgendmöglich zu gestalten, stehen mit den Bedürfnissen der Praxis im Widerspruch. Daher ist es für die Betriebsleiter, aber auch für den verantwortlichen Hygieniker von ausschlaggebender Wichtigkeit, schnell zu erfahren, wie die Beschaffenheit des Trinkwassers oder Badewassers ist. Es ist daher vor allem der Ausbau von Untersuchungsverfahren zu fördern, die eine schnelle, wenn auch anfänglich nur vorläufige Beurteilung zulassen. Ich erinnere hier an den Nachweis der Bakterien der Coli-Aerogenes-Gruppe in mit Trypsin angedautem Peptonnährboden, in welchem ein rasches Wachstum erfolgt. Lange Untersuchungsverfahren, die fast an die Inkubationszeit der etwa zu befürchtenden Uebertragung heranreichen, verursachen der Verantwortung tragenden Leitung Beschwernisse, da sie nach Erhalt des ungünstigen Befundes, also nach 9—10 Tagen, festzustellen hat, worauf diese Befunde zurückzuführen sind. Bei einem Badebetrieb gibt es aber nicht allein eine ständig wiederkehrende Erhöhung der Besucherzahl, wie z. B. am Freitag und Sonnabend, sondern auch sonst gibt es Schwankungen in der Besucherzahl, die auf Witterungseinflüsse usw. zurückzuführen sind. Es können ferner Störungen in der Entkeimungsapparatur usw. vorgelegen haben, die nach dieser Zeit nur schwer einwandfrei zu klären sind.

Dr. Anton legt Wert darauf, daß nicht an einer Stelle eines Schwimmbeckens Proben entnommen werden sollen, sondern daß insgesamt 12 Proben an verschiedenen Stellen und aus verschiedenen Tiefen zu nehmen sind. Allgemein wird der Grundsatz vertreten, daß eine Ueberwachung einer Wasserversorgungsanlage oder eines Badebetriebes nur dann den an sie zu stellenden Anforderungen gerecht wird, wenn sie oft erfolgt. Wenn z. B. ein Schwimmbeckenwasser, wie es eigentlich die Regel sein müßte, dreimal die Woche untersucht wird, so würden, wenn Proben an 12 Stellen entnommen werden müssen, monatlich über 140 Proben zur Untersuchung kommen. Muß die betreffende Verwaltung für Untersuchung jeder Probe bezahlen, so ist dies eine außerordentliche, kaum tragbare Belastung. Ich möchte mich daher dafür einsetzen, lieber an 12 verschiedenen Tagen 1 Probe zu nehmen als an einem Tage 12.

Ich möchte auch dahingestellt sein lassen, ob tatsächlich die Entnahme von 12 Proben zur Beurteilung der Uebertragungsgefahr, auch bei der Anlegung eines strengen Maßstabes, erforderlich ist. Es ist in diesem Zusammenhang auf die beachtenswerten Ausführungen von Prof. Beger[2]) hinzuweisen.

Auf die Ausführungen von Herrn Prof. Gundel möchte ich darauf hinweisen, daß einem Schwimmbecken jeden Tag eine ziemlich erhebliche Menge angewärmtes Frischwasser zugesetzt wird. Die Kosten einer Frischfüllung liegen besonders in der Erwärmung der großen Wassermenge.

Zu der Frage, die Geheimrat Kruse aufgeworfen hat, ob die Chlorung oder die Silberung eines Wassers das Gegebenere ist, ist nicht in einigen Sätzen zu beantworten. Die üblen Nebenerscheinungen der Chlorung sind kaum auf das Chlor als solches zurückzuführen, sondern auf die Verbindungen des Chlores mit den im Wasser gelösten Substanzen, namentlich organischer Natur. Ein zu chlorendes Wasser ist vor der Chlorung daher so aufzubereiten, daß es von den Stoffen, die zu Chlor-Additionsprodukten führen, möglichst befreit wird. Als sehr gutes Mittel ist die Ausflockung mit schwefelsaurer Tonerde vor der Filtration zu empfehlen. Es kann noch dadurch verstärkt werden, daß das so vorbehandelte Wasser über gekörnte Aktivkohle geleitet wird, oder wenn man der Tonerde gleich Aktivkohlepulver zusetzt. Erst dann soll dem so gereinigten Wasser Chlor zugesetzt werden. Es ist hervorzuheben, daß das Chlor und auch das Brom Entkeimungsmittel sind, die schon nach kurzer Zeit (5—15 Min.) genügend entkeimend wirken. Da die nachhaltende Wirkung fehlt, muß im Schwimmbecken absichtlich ein Ueberschuß an Chlor verbleiben. Ich habe im Gas- und Wasserfach[3]) ausgeführt, daß mit gutem Erfolg nach der Chlorung, kurz vor dem Einlauf in das Schwimmbecken, dem mit Kupfer und Chlor versetzten Wasser zur Entchlorung und nachhaltender Entkeimungswirkung Wasserstoffsuperoxyd zugesetzt wird.

---

1) Inaugural-Dissertation, Königsberg i. Pr. 1926.

2) Hans Beger, Zur Frage der Uebertragung von Krankheiten durch Hallenschwimmbadwasser. Kl. Mitteilungen d. Ver. f. Wasser-, Boden- u. Lufthygiene **11**, 1 (1935).

3) Wo. Olszewski, Einige Probleme der Wasserreinigung. Gas- und Wasserfach 1938, **81**, 430.

Für die Silberung sind ganz andere Voraussetzungen notwendig als für die Chlorung. Seit Jahren habe ich mich mit der Silberung des Wassers befaßt[1]. Ich möchte hervorheben, daß nach meinen Erfahrungen keine schwerwiegenden Unterschiede darin bestehen, ob man dem Wasser auf elektrolytischem Wege Silber zufügt oder in Form eines Silbersalzes. Es ist somit gleichgültig, ob man das Cumasinaverfahren oder das Katadynverfahren anwendet oder eine Silbernitratlösung vorsichtig und gleichmäßig zufügt. Da Silbersalz aus Silberabfällen gemacht wird, ist das letztere Verfahren sogar zeitgemäßer. Eine Silberung kommt besonders dort in Frage, wo nach der Zugabe eine längere Speicherung gewährleistet ist, z. B. bei der Auffüllung von frisch gereinigten Wasserbehältern usw. Auch tötet die Silberung manche Organismen, z. B. Aktinomyzeten besser ab als Chlor. Es setzt aber ein vollkommen klares und kolloidfreies Wasser voraus. Man muß somit auch für die Silberung eines Badewassers eine gute Vorbehandlung, Ausflockung mit Tonerde usw., verlangen.

Bei gut vorbehandeltem Wasser verdeckt Chlor, wenn auch oft in unangenehmer Weise, den üblen Badegeruch, während eine Silberung ihn nicht verdeckt und daher eine gute Vorbehandlung des Wassers erst recht notwendig macht.

H. Anton (München) Schlußwort:

Es ist mir selbstverständlich nicht möglich, in der Kürze der für das Schlußwort zur Verfügung stehenden Redezeit auf die umfangreichen Ausführungen des Herrn Olszewsky ausführlich zu antworten. Ich behalte mir das für eine Veröffentlichung an anderer Stelle vor. Nur auf *einen* grundlegenden Irrtum des Herrn O. möchte ich hier hinweisen: Mein Thema lautete: Die Technik der Untersuchung von chloriertem Hallenschwimmbadwasser. Ich hatte demgemäß keineswegs die Absicht, mich heute hier in eine Kritik der modernen Badewasseraufbereitungsverfahren einzulassen. Ich darf Herrn O. allerdings die Zusicherung geben, daß ich auch die Behandlung dieses Themas nicht gescheut hätte, nachdem ich in nunmehr fast dreijähriger umfangreicher experimenteller Arbeit in Labor und Schwimmbädern Gelegenheit hatte, die verschiedensten modernen Verfahren der Badewasseraufbereitung gründlich zu studieren. Mir sind auch die interessanten Untersuchungen von Nachtigall und Ali, auf die Herr O. hinweist, durchaus bekannt. Ich habe sie in meinem Vortrage ausdrücklich erwähnt. Zu meinem Thema stehen sie nur in indirekter Beziehung. Von Bedeutung erscheint mir allerdings, daß Pick und Gruschka in ihrer Kritik der Untersuchung von Nachtigall und Ali darauf aufmerksam gemacht haben, daß der einzige sichere Maßstab für die Beurteilung eines Badewasseraufbereitungsverfahrens zur Zeit noch der bakteriologische Test sei. Um so mehr bedauere ich die Ausführungen des Herrn O. Ich sah gerade meine Aufgabe darin, die von Remy bereits 1934 als notwendig erkannte Forderung der Vereinheitlichung der Methoden der Untersuchung von Hallenschwimmbädern *noch einmal nachdrücklichst in Erinnerung zu bringen*. Wir hatten die Hoffnung, auf diese Weise zu einer Aufklärung mancher grundlegender Widersprüche, die sich im Schrifttum über die Beurteilung von Badewasseraufbereitungsverfahren finden, zu kommen. Dringend notwendig erscheint es uns, die an *verschiedenen Orten von verschiedenen Untersuchern zu sammelnden Erfahrungen dadurch erst wirklich vergleichbar zu machen, daß man die zahlenmäßigen Unterlagen mit gleicher einheitlicher Methodik gewinnt.*

Der Vorschlag des Herrn O. trotz Kenntnis der Arbeiten von Remy und anderen Untersuchern, die die Angaben von Remy vollauf bestätigten, nun doch auch in Zukunft nach wie vor nach 48 Std. zu zählen, erscheint uns völlig abwegig. Wir haben kein Verständnis dafür, wenn es dann in den Katalogen der Firmen, die Badewasseraufbereitungsapparaturen liefern, etwa heißt: Die Keimzahl betrug trotz zahlreicher sorgfältiger bakteriologischer Untersuchungen ständig 0 oder bewegte sich zwischen 3 und 7 pro ccm, und wenn man 8 Tage gewartet hätte bis zur Zählung, hätte man viele Tausende von Keimen gefunden.

Herr O. hält unsere Forderungen für überspitzt. Wir stehen jedenfalls auf dem Standpunkt, daß, solange Bacterium coli in einem Badewasser gefunden wird, grundsätzlich die Möglichkeit einer Infektion des Badenden, beispielsweise mit Typhus, nicht von der Hand zu weisen ist. Auch ein sehr geschwächter Typhusbazillus kann, worauf ich bereits in meinem Vortrag hingewiesen habe, wenn er zufälligerweise gerade von einem Badenden mit einer Achylie aufgenommen wird, unserer bisherigen Kenntnis nach durchaus eine Typhuserkrankung bewirken. Es ist klar, daß die Erkrankungswahrscheinlichkeit mit der Häufigkeit des Colibefundes im Badewasser zunimmt.

---

1) Wo. Olszewski, Die Desinfektion vom Wasser mit Silbersalzen sowie mit Katadynsilber. Jahrbuch vom Wasser **3**, 91 (1929). — Chlor- und Silberung des Schwimmbeckenwassers in Verbindung mit Chlorkupferung. Gesdh.ing., 1930, **53**, 728 und andere.

Ich möchte auch in diesem Zusammenhang nur einmal daran erinnern, daß (nach der süddeutschen Statistik) die Aetiologie von etwa 40 Proz. aller Typhuserkrankungen niemals geklärt wird[1]).

Ich möchte aber andererseits auch darauf hinweisen, daß wir bei richtig durchgeführtem und überwachtem Verfahren der Chlorierung in einem Hallenbad mit relativ großer Besucherzahl Bacterium coli auch in 100 ccm bei Entnahme auch sehr zahlreicher Proben während des Hochbetriebes nicht gefunden haben.

Wenn Herr O. sagt, 6 Proben oben und unten seien ihm zuviel und es wäre dann besser, an 12 verschiedenen Tagen je eine Probe zu entnehmen, so möchte ich darauf folgendes erwidern: Für die wissenschaftliche Beurteilung eines Verfahrens der Badewasseraufbereitung sagt mir eine sorgfältige Untersuchung mit soweit als möglich gesicherten Zahlen und vollständigen Angaben mehr als 12 ungesicherte Einzelwerte. Im übrigen ist es natürlich Geschmacksache, welchen Genauigkeitsmaßstab man seiner Untersuchungstechnik zugrundelegt. Für die Zwecke der Praxis, d. h. zum Zwecke einer laufenden Ueberwachung eines Hallenbades, kann man wohl auch mit einer geringeren Zahl von Entnahmestellen auskommen. Nur darf man seinen Befunden dann nicht das Gewicht wissenschaftlicher Erkenntnisse beimessen.

Kruse (Leipzig) Schlußwort:

Der Beifall, den Sie meinem Vortrage gezollt, ließ von vornherein erwarten, daß sich nicht viele Freunde der Chlorung zum Worte melden würden, und was von ihnen vorgebracht wurde, scheint mir bezeichnend zu sein. Zunächst wurde zwar allgemein die Schwierigkeit der Dosierung des Chlors zugegeben, aber als ein Mittel, sie zu überwinden, eine genaue Kontrolle verlangt. Gewiß hätte man dadurch auch die große Typhusepidemie von Hannover verhüten können. Daß das aber selbst in einem so großen Wasserwerke nicht geschehen ist, zeigt doch gerade die Schwierigkeiten und Gefahren, denen man bei der Chlorung begegnet. Auch in den Wasserwerken des Ruhrkohlenbezirks hat man Störungen bei der Chlorung beobachtet, die freilich bisher nicht Infektionen, sondern nur recht unangenehme Geruch- und Geschmacksveränderungen des Wassers verursacht haben. Hier liegen aber die Dinge sonst verhältnismäßig sehr günstig für die Chlorung. Die gelegentlich hohen Keimzahlen in den Ruhrwasserwerken sind mehr Schönheitsfehler, als gefahrdrohend, weil sie, wie ich aus eigener vieljähriger Erfahrung weiß, niemals von bemerkenswerten Typhusepidemien oder von der sog. Wasserkrankheit, die an der Elbe eine so große Rolle spielt, begleitet werden. Daher kommt man im Ruhrtal mit vergleichsweise niedrigen Chlormengen aus und bedarf nicht der sonst nötigen großen Vorratsbehälter, weil auch ohne sie die lästigen Chlorüberschüsse aus dem Wasser ziemlich vollständig verschwinden. Viel weniger günstig steht die Sache aber in Dresden, wo fast jedes Hochwasser nicht bloß ein Steigen der Keimzahlen, sondern auch jene recht gefährliche „Wasserkrankheit" herbeiführt. Sicher ist es also kein Zufall, daß Olszewski hier das Bedürfnis nach einem mindestens teilweisen Ersatz der Chlorung gespürt und zu dem Zwecke unabhängig von uns ein Versilberungsverfahren benutzt hat. Selbstverständlich wären wir auch zur Bekämpfung der Chlorschäden mit diesen oder anderen Versilberungsverfahren zufrieden, empfehlen aber die Cumanisierung, weil sie sich seit vielen Jahren als das technisch beste Verfahren, aktives Silber in das Wasser hineinzubringen, bewährt hat.

---

1) Man vergleiche hierzu z. B. die interessanten Angaben von Rimpau in Münch. med. Wschr. **72**, 1965 (1925), nach denen es in den Jahren 1913—1924 in Südbayern nur gelang, 53,9 Proz. der Typhusfälle bezüglich der Herkunft eindeutig aufzuklären.

Mitgliederliste
der Deutschen Vereinigung für Mikrobiologie.

1. Vorstand:

Vorsitzender: Vizepräsident Prof. Dr. med. E. Gildemeister.

Schriftführer: Prof. Dr. med. habil. et phil. T. Wohlfeil.

Vorstandsmitglieder: Prof. Dr. med. vet. K. Bierbaum.
Prof. Dr. med. H. Dold.
Prof. Dr. med. P. Manteufel.
Präsident Prof. Dr. med. H. Reiter.
Prof. Dr. med. H. Selter.
Oberregierungsrat Dr. phil. C. Stapp.

2. Ehrenmitglieder:

Geheimer Medizinalrat Prof. Dr. med. R. Pfeiffer, Breslau, Hobrechtufer 12.

3. Korrespondierende Mitglieder:

1. Professor Dr. Azzo Azzi, Direktor des Hygienischen Instituts der Universität Turin (Italien), Turin 116, Via Bidone 37.
2. Professor Dr. Julius v. Darányi, Direktor des Hygienischen Instituts der Universität Budapest (Ungarn), Budapest VIII, Esterhazy-utca 9.
3. Professor Dr. Costantino Gorini, Mailand (Italien), Via Orcagna, 4.
4. Univ.-Professor Dr. Wladimir N. Markow, Direktor des Hygienischen Instituts der Universität Sofia (Bulgarien), Sofia 5, Marfistr. 20.
5. Professor Dr. J. Tomcsik, Direktor des Ungar. Staatl. Hygienischen Instituts Budapest (Ungarn), Budapest IX, Gyáli ut 4.

4. Medizinische und veterinär-medizinische Sektion.

Nr.	Name	Amtscharakter	Wohnort	Nähere Adresse
1	Abel	Geh. Ober-Med.-Rat, Prof., Dr. med.	Jena	Reichardtstieg 2
2	Albrecht, B.	Prof., Dr. med. vet.	Frankfurt/Main	Ludwig-Rehn-Str. 42/44
3	v. Angerer	Dir., Prof., Dr. med.	Erlangen, Wasserturmstr. 3	Hygienisches Institut
4	Anton, Hellmut	Oberarzt, Dr. med.	München, Pettenkoferstr. 34	Hygienisches Universitäts-Institut
5	Aschoff	Geh. Hofrat, Prof., Dr. med.	Freiburg/Br.	Jacobistr. 29
6	Bach	Dir., Prof., Dr. med.	Saarbrücken, Gneisenaustr.	Hygienisches Institut
7	Bachmann, W.	Dir., Prof., Dr. med.	Kiel, Hospitalstr. 34	Hygienisches Institut der Universität
8	Baerthlein	Prof., Dr. med.	Würzburg	Friedrichstr. 27
9	Barnewitz	Oberstabsarzt, Dr. med.	Königsberg/Pr.	Standortlazarett
10	Barthel, Erich	Dr. med.	Halle/S.	Städt. Gesundheitsamt, Bakt. Abtlg.
11	Beller, Karl	Prof., Dr. med. vet.	Gießen	Veterinärhygienisches und Tierseucheninstitut

Nr.	Name	Amtscharakter	Wohnort	Nähere Adresse
12	Besserer	Dir., Prof., Dr. med.	Münster/Westf., Alter Steinweg 33	Med.-Unters.-Amt
13	Bickert, F. W.	Dr. med.	Marburg/Lahn	Marbacher Weg 27
14	Bieber	Ministerialrat, Dr. med.	Berlin, Unter den Linden 72—74	Reichsministerium des Innern
15	Bieling, R.	Prof., Dr. med.	Wien X, Priester-str. 50	Staatl. Serotherapeutisches Institut
16	Bierbaum, K.	Dir., Prof., Dr. med. vet.	Berlin NW 7, Luisenstr. 56	Institut f. Tierseuchentherapie der Univ.
17	Blaurock, G.	Oberarzt, Dr. med.	Berlin N 65, Föhrerstr. 2	Institut Robert Koch
18	Blumenberg, W.	Dir., Prof., Dr. med.	Breslau, Robert-Koch-Str. 4	Hygienisches Institut
19	Boecker, E.	Abt.-Leiter, Prof., Dr. med.	Berlin N 65, Föhrerstr. 2	Institut Robert Koch
20	Bongert, J.	Prof., Dr. med. vet.	Klein-Machnow	Märkische Str. 12
21	v. Bormann, F.	Dozent, Dr. med. habil.	Bremen, St. Jürgenstr.	Staatl. Hygienisches Institut
22	Brekenfeld	Oberstabsarzt a. D., Dozent, Dr. med. habil.	Berlin NW	Lessingstr. 13
23	Bruns, H.	Dir. i. R., Prof., Dr. med.	Hannover	Haeckelstr. 3
24	Bürger, B.	Abt.-Dir., Prof., Dr. med.	Berlin-Dahlem, Correnspl. 1	Landesanstalt für Wasser-, Boden- und Lufthygiene
25	Bürgers, J.	Dir., Prof., Dr. med.	Königsberg/Pr., Steindamm 9 B	Hygienisches Inst. d. Univ.
26	Christiansen, W.	Dir., Dr. med.	Hannover	Staatl. Med.-Unters.-Amt
27	Clauberg, K. W.	Dir., Prof., Dr. med.	Berlin NO, Landsberger Allee	Bakt.-Serol.-Institut am Horst-Wessel-Krankenhaus
28	Czaplewski	Dir. i. R., Prof., Dr. med.	Köln/Rhein	Vorgebirgstr. 9
29	Dahr, P.	Dozent, Dr. med. habil.	Köln-Lindenthal, Gleuelerstr. 77	Hygienisches Inst. d. Univ.
30	Danielsen, E.	Oberstarzt, Dr. med.	Hannover	Rühmkorffstr. 11
31	David, H.	Dir., Prof., Dr. med. vet.	Wien III, Linke Bahngasse 11	Tierärztliche Hochschule
32	Deicher, H.	Chefarzt, Dr. med.	Hannover, Dachenhausenstr. 5	Friederikenstift
33	Demnitz, A.	Betriebsleiter, Dr. med. vet.	Marburg/Lahn	Behring-Werke
34	Dietrich, A.	Prof., Dr. med.	Tübingen	Pathologisches Inst. d. Univ.
35	Dietrich, W.	Oberstarzt, Dr. med.	Berlin W, Bendlerstr. 35	Reichskriegsministerium
36	Doerr	Dir., Prof., Dr. med.	Basel (Schweiz), Peterspl. 10	Hygienisches Institut
37	Dold, H.	Dir., Prof., Dr. med.	Freiburg/Br., Hebelstr. 42	Hygienisches Inst. d. Univ.
38	Döll, A.	Abt.-Vorsteher, Dr. med. et phil.	Bern-Kirchenfeld	Institut zur Erforschung der Infektionskrankheiten
39	Donle	Oberstabsarzt, Dr. med.	Wien	Hygieniker b. Wehrkreis XVII
40	Draese, K. D.	Marine-Stabsarzt, Dr. med.	z. Zt. München, Pettenkoferstr. 34	Hygienisches Inst. d. Univ.
41	Dresel, E. G.	Dir., Prof., Dr. med. et phil.	Leipzig, Liebigstr. 24	Hygienisches Institut
42	v. Drigalski	Prof., Dr. med.	Berlin-Charlottenburg	Marienburger Allee 12
43	v. Dungern, Freih.	Prof., Dr. med.	Ludwigshafen/Bodensee	—
44	Ehrismann, O.	Prof. Dr. med.	Hamburg-Othmarschen	Dürerstr. 6
45	Eickmann, H.	Dir., Dr. med. vet.	Bonn/Rhein, Rheindorfer Str. 92	Tiergesundheitsamt bei der Landesbauernschaft Rhld.
46	v. Engelhardt, Baron Alex.	Dr. med.	Leverkusen	Behringwerke der I.G. Farben
47	Engelhardt, Joh. Karl	Stabsarzt Dr. med.	Hamburg 4, Bernhard-Nocht-Str. 74	Tropeninstitut

Nr.	Name	Amtscharakter	Wohnort	Nähere Adresse
48	Engelhardt, W.	Dir., Prof., Dr. med.	Tübingen	Univ.-Hautklinik
49	Ernst, W.	Dir., Prof., Dr. med.	München, Veterinärstr. 6	Tierhygienisches Institut
50	Eugling, M.	Vorstand, Prof., Dr. med.	Wien IX, Kinderspitalgasse 15	Hygien. Inst. d. Univ.
51	Eyer, Herm.	Oberarzt, Dozent, Dr. med. habil.	Berlin NW, Scharnhorststr. 35	Militärärztl. Akademie
52	Evers	Geschwaderarzt, Dr. med.	Swinemünde	Herrendorferstr. 4
53	Feldt, A.	Dr. med.	Berlin-Charlottenburg	Fa. Schering A.-G.
54	Ficker	Geh. Med.-Rat, Prof., Dr. med.	São Paulo (Brasilien)	Praca da Republica 15
55	Fischer, W.	Abt.-Leiter Prof. Dr. med.	Berlin N 65, Fohrerstr. 2	Institut Robert Koch
56	Flückiger, G.	Dir., Dr. med. vet.	Bern (Schweiz), Schäferstr. 8	Eidgen. Veterinäramt
57	Fortner, J.	Prof., Dr. med. vet.	Berlin-Dahlem, Unter d. Eichen 82	Reichsgesundheitsamt
58	Fromme	Stadtarzt, Prof., Dr. med.	Witten/Ruhr	Franzenstr. 1
59	Funccius	Prosektor, Dr. med.	Wuppertal-Elberfeld	Menzelstr. 5
60	Fußgänger, R.	Leiter, Dr. med. et phil.	Frankfurt/Main-Hochst	Chemotherap. Labor. d. Werkes Höchst d. I.G. Farben
61	Gehrke	Dir. i. R., Dr. med.	Stettin	Scharnhorststr. 2
62	Geiger, W.	Leiter, Dr. med. vet.	Verden/Aller	Sedanstr. 34
63	Gerlach, F.	Hofrat, Prof., Dr. med. vet.	Mödling bei Wien	—
64	Gersbach	Oberreg.- u. Obermed.-Rat Dr. med.	Minden/Westf.	Besselstr. 6
65	Geschke, Fr.	Oberstabsarzt, Dr. med.	Hannover, Gretchenstr. 20	Hygieniker beim Wehrkreis XI
66	Gildemeister, E.	Vizepräsident, Prof., Dr. med.	Berlin N 65, Föhrerstr. 2	Institut Robert Koch
67	Gins, H. A.	Abt.-Dir., Prof., Dr. med.	Berlin N 65 Föhrerstr. 2	Institut Robert Koch
68	Gminder, A.	Ober-Reg.-Rat, Dr. med. vet.	Stuttgart	Azenbergstr. 146
69	Goerttler	Prof., Dr. med. vet.	Jena, Dornburger Str. 23/29	Veterinäranstalt
70	Gotschlich, E.	Dir., Prof., Dr. med.	Ankara (Türkei)	Sohage 26
71	Graetz	Abt.-Vorsteher, Prof., Dr. med.	Hamburg 30	Jungfernstieg 26/30
72	Grassberger	Dir., Prof., Dr. med.	Wien IX, Kinderspitalgasse 15	Hygien. Inst. d. Univ.
73	Gräub, E.	Privatdozent Dr. med.	Bern (Schweiz), Seilerstr. 23	Bakteriolog. Laboratorium
74	Groß, H.	Dr. med.	Hildesheim, Bernwardstr. 31	Institut für Diagnostik u. exper. Medizin
75	Großmann, H. A.	Prof., Dr. med. habil.	Landsberg/W.	Hygienisches Institut
76	Grunske, Fr.	Marineoberstabsarzt, Dr. med.	Wilhelmshaven	Roonstr. 83
77	Grütz	Dir., Prof., Dr. med.	Bonn/Rhein	Poppelsdorfer Allee 65
78	Gundel, M.	Dir., Prof., Dr. med. et phil.	Gelsenkirchen, Rotthauserstr. 19	Hygienisches Institut des Ruhrgebietes
79	Haag, F. E.	Prof., Dr. med.	Düsseldorf, Witzelstr. 109	Hygienisches Institut
80	Haagen, E.	Abt.-Dir., Prof., Dr. med.	Berlin N 65, Föhrerstr. 2	Institut Robert Koch
81	Habs, H.	Prof., Dr. med.	Heidelberg, Thibautstr. 2	Hygien. Inst. d. Univ.
82	Hackenthal, H.	prakt. Arzt, Dr. med.	Borsigwalde	Drostestr. 4
83	Haendel, L.	Geh. Reg.-Rat, Prof., Dr. med.	Berlin-Dahlem	Gustav-Meyer-Str. 1

Nr.	Name	Amtscharakter	Wohnort	Nähere Adresse
84	Hallauer, C.	Dir., Prof., Dr. med.	Bern (Schweiz)	Hyg.-bakt. Inst. d. Univ.
85	Hammerschmidt	Dir., Prof., Dr. med.	Graz, Universitätsstr. 7	Hygien. Inst. d. Univ.
86	Haupt, H.	Prof., Dr. med. vet.	Leipzig O 27	Denkmalsallee 110
87	Haym, W.	Dir., Med.-Rat, Dr. med.	Gumbinnen	Med.-Unters.-Amt
88	Heck	Dir., Dr. med. et phil.	Stade/Elbe, Am Schäferstieg 4	Med.-Unters.-Amt
89	Helm	Ober-Reg.-Rat, Dr. med. vet.	Berlin-Dahlem, Unter den Eichen 82—84	Reichsgesundheitsamt
90	Henneberg, G.	Dr. med.	Berlin-Charlottenburg	Fa. Schering A.G.
91	Herzberg, K.	Prof., Dr. med.	Greifswald	Hygien. Inst. d. Univ.
92	Hetsch, H.	Prof., Dr. med.	Bad Homburg v. d. H.	Kaiser-Friedrich-Promenade 103
93	Hetſche, O.	Dozent, Dr. med. habil. et phil.	München, Pettenkoferstr. 34	Hygienisches Universitäts-Institut
94	Heuer, G.	Med.-Rat u. Kreisarzt, Dr. med.	Calau N.-L.	Staatl. Gesundheitsamt
95	Hilgermann, R.	Dir., Prof., Dr. med.	Landsberg/Warthe	Hygienisches Institut
96	Hilgers, W.	Dir., Prof., Dr. med.	Magdeburg-Sudenburg, Leipziger Str. 44	Hygienisches Institut der Stadt Magdeburg
97	Hoffmann, W. H.	Marine-Generaloberarzt, Prof., Dr. med.	Habana (Cuba) C 52 Cerro 1381	Laboratorio Finlay
98	Hohn, J.	Dir., Dr. med.	Essen, Pettenkoferstr. 30	Bakt.-Serol. Laboratorium
99	Hornung, H.	Oberstabsarzt, Dr. med.	Hamburg	Hygien. Unters.-Stelle des Wehrkreises X
100	Horster, H.	Oberarzt, Doz. Dr. med. habil.	Würzburg, Bau 17	Staatl. Luitpold-Krankenhaus
101	Huebschmann, P.	Dir., Prof., Dr. med.	Düsseldorf, Moorenstr. 5	Pathol. Inst. d. Univ.
102	Jötten, K.	Dir., Prof., Dr. med.	Münster/Westf., Westring 10	Hygienisches Institut
103	Jungeblut, Cl. W.	Prof., Dr. med.	New York City 630 West, 168th Street	Departm. of Bact. Columbia Medical Center
104	Kairies, A.	Oberassistent, Doz., Dr. med. habil.	Halle/Saale, Hindenburgstr. 21	Hygien. Inst. d. Univ.
105	Kaiser, M.	Ministerialrat, Dr. med.	Wien XVI	Possingergasse 38
106	Kalbfleisch, H. H.	Prof., Dr. med.	Dresden A, Fürstenstr. 74	Rud. Heß-Krankenhaus
107	Kappus, A.	Prof., Dr. med.	Göttingen	Geiststr. 9
108	Karsten	Dir., Dr. med. vet.	Hannover	Tiergesundheitsamt der Landesbauernschaft
109	Kathe	Med.-Rat, Dir., Prof., Dr. med.	Breslau, Tiergartenstr. 75	Med.-Unters.-Amt
110	Kayser, H.	Generalstabsarzt a. D., Dr. med.	Kaiserslautern	Hackstr. 19
111	Kersten, H. E.	Med.-Rat, Prof., Dr. med.	Gelnhausen	Heinrich-Mahla-Str. 12
112	Kikuth, W.	Prof., Dr. med.	Wuppertal-Elberfeld	I.G.Werk
113	Kirstein	Med.-Rat, Dir., Prof., Dr. med.	Hannover, Seelhorststr. 44	Med.-Unters.-Amt
114	Kisskalt, K.	Geh. Med.-Rat, Dir., Prof., Dr. med.	München, Pettenkoferstr. 34	Hygienisches Unniversitäts-Institut
115	Klein, K.	Med.-Rat, Dir., Dr. med.	Düsseldorf	Med.-Unters.-Amt
116	Kleine, F. K.	Präsident i. R., Geh. Med.-Rat, Prof., Dr. med.	Berlin-Friedenau	Wielandstr. 7
117	Kleinsorgen, W.	Med.-Rat, Leiter, Dr. med.	Gotha, Schloßberg 2	Bakt. Unters.-Anstalt
118	Kliewe	Ober-Med.-Rat, Prof., Dr. med.	Gießen	Unters.-Amt f. Infektionskrankheiten

Nr.	Name	Amtscharakter	Wohnort	Nähere Adresse
119	Klimmer	Ober-Med.-Rat, Prof., Dr. med.	Leipzig O 27	Denkmalsallee 110
120	Klinge, A.	Dir., Dr. med.	Gera	Staatl. Med. Unters.-Amt
121	Knorr, M.	Dir., Prof., Dr. med.	Würzburg, Bau 17	Luitpoldkrankenhaus
122	Koch, Fr. E.	Abt.-Leiter, Dr. med.	Radebeul II	Meißner Str. 191
123	Kolf P.	Dir., Med.-Rat, Dr. med.	Koblenz	Med. Unters.-Amt
124	Kollath, W.	Dir., Prof., Dr. med.	Rostock, Gertrudenstr. 9	Hygien. Inst. d. Univ.
125	Konrich, F.	Vizepräs., Prof., Dr. med.	Berlin-Dahlem, Corrensplatz 1	Landesanstalt für Wasser-, Boden- und Lufthygiene
126	Koschucharoff, P.	Dir., Dr. med. et med. vet.	Sofia (Bulgarien), ul Regentska 26	Inst. f. Volksgesundheit
127	Krehnke, W.	Marine-Oberassistenzarzt, Dr. med.	Kiel-Wik	Hygien. Abt. d. San.-Amtes d. Marinestat. Ostsee
128	Krumbein, F. C.	Prof., Dr. med.	Bern (Schweiz)	Friedbühlstr. 22
129	Kruse, W.	Geh. Med.-Rat, Prof., Dr. med.	Leipzig O 27	Bozener Weg 28
130	Kudicke, R.	Med.-Rat, Prof., Dr. med.	Frankfurt/Main, Ludwig-Rehn-Str. 42—44	Staatl. Inst. f. experim. Therapie
131	Küster, E.	Dir., Prof., Dr. med.	Frankfurt/Main, Ludwig-Rehn-Str. 40	Städt. Hygien. Univ.-Inst.
132	Lange, B.	Abt.-Leiter, Prof., Dr. med.	Berlin N 65, Föhrerstr. 2	Institut Robert Koch
133	Lange. L.	Prof., Dr. med.	Berlin-Friedenau	Hähnelstr. 9
134	Laubenheimer K.	Prof., Dr. med.	Frankfurt/Main Ludwig-Rehn-Str. 42—44	Staatl. Inst. f. experim. Therapie
135	Laun, R. H.	Oberfeldarzt, Dr. med.	München	Ganghoferstr. 56
136	Lehmann, K. B.	Geh. Rat, Prof., Dr. med.	Würzburg	Schellingstr. 20
137	Lentz, O.	Geh. Ober-Med.-Rat, Prof., Dr. med.	Berlin-Schmargendorf	Weinheimer Str. 17a
138	Lentze, Fr. A.	Dir., Prof., Dr. med.	Beuthen/O.S., Hindenburgstr. 39a	Hygien. Institut
139	Lerche	Dir., Prof., Dr. med. vet.	Berlin NW 7, Luisenstr. 56	Inst. f. Lebensmittelhygiene
140	Lippelt, H.	Dr. med.	Hamburg 4, Bernhard-Nocht-Str. 74	Tropeninstitut
141	Löns, M.	Dir., Dr. med.	Dortmund	Hyg.-bakt. Institut
142	Lutz, G.	Dir., Prof., Dr. med.	Stuttgart	Katharinenhospital
143	Lührs, Ernst	Generalstabsveterinär a. D., Prof., Dr. med. vet.	Berlin-Lichterfelde	Gardeschützenweg 119
144	Lührs, Erich	Dir., Dr. med. vet.	Oldenburg/O.	Tiergesundheitsamt
145	Lütje	Vet.-Rat, Dir., Dr. med. vet.	Stade/Elbe	Fohlen-Unters.-Stelle
146	Maaß, J.	Stabsarzt Dr. med.	z. Zt. Berlin N 65, Föhrerstr. 2	Institut Robert Koch
147	Mahnkopf	Oberfeldarzt, Dr. med.	Stettin	Augustastr. 46
148	Malamos, B.	Oberarzt, Doz., Dr. med. habil.	Athen (Griechenl.), Homerstr. 54	Therap.-mediz. Univ.-Klinik
149	v. Mallinckrodt-Haupt, A. St.	Dozentin, Dr. med. habil.	Brühl/Köln	Schützenstr. 24
150	Manteufel, P.	Dir., Prof., Dr. med.	Düsseldorf, Witzelstr. 109	Hygien. Inst. d. Univ.
151	Marmann	Ministerialrat a. D., Dr. med.	Berlin-Schmargendorf	Weinheimer Str. 18
152	Martini, Erich	Prof., Dr. med.	Bogota (Columbien)	—
153	Mayer, Otto	Ober-Reg.-Med. Rat, Dr. med.	Nürnberg	Marienstr. 4
154	Meier, Georg	Med.-Rat, Kreisarzt, Dr. med.	Pinneberg	—

Nr.	Name	Amtscharakter	Wohnort	Nähere Adresse
155	Meinicke, E.	Prof., Dr. med.	Berlin-Dahlem	Thielallee 60
156	Menk, W.	Dr. med. habil.	Hamburg 4, Bernhard-Nocht-Str. 74	Tropeninstitut
157	Mießner	Dir., Prof., Dr. med. vet.	Hannover	Hygien. Inst. d. Tierärztl. Hochschule
158	Minning, W.	Dr. med. et phil.	Hamburg 4, Bernhard-Nocht-Str. 74	Tropeninstitut
159	Möllers, Bernhard	Ober-Reg.-Rat, Prof., Dr. med.	Berlin NW 87, Klopstockstr. 18	Reichsgesundheitsamt
160	Mrugowsky, J.	SS-Truppenarzt I. d. Leibstandarte, Leiter d. Hyg. Unters.-Stelle, Dr. sc. nat. et med. habil.	Berlin-Wannsee	Am kl. Wannsee 28
161	Mühlens, P.	Dir., Prof., Dr. med.	Hamburg 4, Bernhard-Nocht-Str. 74	Tropeninstitut
162	Müller, Max	Vet.-Dir., Prof., Dr. med. vet.	München 2 SO	Zenettistr. 2—3
163	Müller, Otto	Dir., Dr. med.	Duisburg	Bakteriologisches Institut
164	Müller, Reiner	Dir., Prof., Dr. med.	Köln/Lindenthal, Gleuelerstr. 77	Hygien. Inst. d. Univ.
165	Mutschler, P.	Dr. med.	Berlin N 65, Föhrerstr. 2	Institut Robert Koch
166	Nauck, E. G.	Prof., Dr. med.	Hamburg 4, Bernhard-Nocht-Str. 74	Tropeninstitut
167	Neufeld, F.	Präsident i. R., Geh. Med.-Rat, Prof., Dr. med.	Berlin-Wilmersdorf	Nassauische Str. 53
168	Nieberle	Dir., Prof., Dr. med.	Leipzig C 1	Kärntnerstr. 4
169	Nissle	Prof., Dr. med.	Freiburg/Br., Fürstenbergstr. 15	Bakteriol. Forschungsinstitut
170	Nocht, B.	Geh. Ober-Med. Rat, Prof., Dr. med.	Wiesbaden	Blumenstr. 8
171	v. Ostertag	Ministerialdir. i. R., Prof., Dr. med.	Tübingen	Biesingerstr. 52
172	Otto, R.	Geh. Med.-Rat., Dir., Prof., Dr. med.	Frankfurt/Main, Ludwig-Rehn-Str. 42—44	Staatl. Inst. f. exper. Therapie
173	Pels Leusden, Fr.	Oberassistent, Dr. med. habil.	Kiel, Hospitalstr. 34	Hygien. Inst. d. Univ.
174	Pesch, K.	Abt.-Dir., Prof., Dr. med.	Berlin NW 7, Dorotheenstr. 28a	Hygien. Inst. d. Univ.
175	Peter, H.	Dr. med.	Berlin N 65, Föhrerstr. 2	Institut Robert Koch
176	Petruschky, J.	Stadtarzt i. R., Prof., Dr. med.	Berlin-Charlottenb.	Waitzstr. 20
177	Pfannenstiel, W.	Dir., Prof., Dr. med.	Marburg/Lahn, Pilgrimstein 2	Hygien. Inst. d. Univ.
178	Piringer, W.	Dr. med.	Wien IX, Leichenhof, Spitalgasse	Pathol.-anat. Inst. d. Univ.
179	Poppe	Dir., Prof., Dr. med. vet. et phil.	Rostock	Blücherpl. (Palais)
180	Prigge, R.	Prof., Dr. med.	Frankfurt/Main, Ludwig-Rehn-Str. 42—44	Staatl. Inst f. exper. Therapie
181	Pröscholdt	Dir., Dr. med. vet.	Züllchow/Pomm.	Tiergesundheitsamt d. Landesbauernschaft
182	Rautenberg, H.	Med.-Rat, Dr. med.	Schlochau	—
183	Rautmann	Dir., Dr. med. vet.	Halle/S.	Tiergesundheitsamt d. Landesbauernschaft
184	Reichel, H.	Prof., Dr. med.	Graz, Universitätspl. 4	Hygien. Inst. d. Univ.
185	Reiß, E.	Stabsarzt, Dr. med.	München, Pettenkoferstr. 34	Hygien. Universitäts-Institut

Nr.	Name	Amtscharakter	Wohnort	Nähere Adresse
186	Reißland, E.	Dir., Med.-Rat, Dr. med.	Koblenz	Med. Untersuchungsamt
187	Reiter, H.	Präsident, Prof., Dr. med.	Berlin NW. 87, Klopstockstr. 18	Reichsgesundheitsamt
188	Reploh, H.	Dozent, Dr. med. habil.	Münster/Westf., Geiststr. 106	Hygienisches Institut
189	Richters	Generalveterinär, Prof., Dr. med. vet.	Berlin NW. 7	Hannoversche Str. 27
190	Rimpau	Dir., Prof., Dr. med.	Solln/München	Bakt. Untersuchungs-Anstalt
191	da Rocha-Lima	Prof., Dr. med.	São Paulo (Brasil.)	Instituto Biologico
192	Rohrmann, N.	Oberfeldarzt, Dr. med., Korpshygieniker VI	Münster/Westf.	Hüfferstr. 75
193	Rose, G.	Abt.-Direktor, Prof., Dr. med.	Berlin N 65, Föhrerstr. 2	Institut Robert Koch
194	Rodenwaldt	Dir., Prof., Dr. med.	Heidelberg, Thibautstr. 2	Hygien. Inst. d. Univ.
195	Rothermundt, M.	Prof., Dr. med.	Frankfurt/Main, Ludwig-Rehn-Str. 42—44	Staatl. Inst. f. exper. Therapie
196	Ruge, H.	Flottenarzt, Prof., Dr. med.	Kiel-Wik	Hygien. Abt. d. San.-Amtes d. Marinestat. d. Ostsee
197	Ruppert	Prof., Dr. med. vet.	Meldorf/Holstein	—
198	Ruska, H.	Dr. med.	Berlin NW, Schumannstr.	I. Med. Klinik d. Charité
199	Saleck, W.	Prof., Dr. med.	Stuttgart W	Röckenwiesenstr. 58
200	Sartorius, F.	Oberstabsarzt, Prof., Dr. med.	Berlin NW, Scharnhorststr. 35	Militärärztl. Akademie
201	Sauer, W.	Med.-Rat, Dr. med.	Erfurt, Nordhäuser Str. 74	Med.-Untersuchungsamt
202	Schad	Oberfeldarzt, Dr. med.	Stuttgart O	Spittlerstr. 12
203	Schaede	Med.-Rat, Dir., Dr. med.	Magdeburg	Med.-Untersuchungsamt
204	Schermer	Prof., Dr. med.	Göttingen	Groner Landstr. 2
205	Schiemann, O.	Prof., Dr. med.	Berlin-Charlottenburg	Friedericiastr. 14
206	Schilling, Cl.	Prof., Dr. med.	Berlin W.	Lietzenburgstr. 12
207	Schinzel, A.	Dozent, Dr. med. habil.	Wien 19	Suttingergasse 8
208	Schlirf, K.	Med.-Rat., Dr. med. habil.	Oldenburg/O.	Landes-Hygiene-Institut
209	Schloßberger, H.	Abt.-Direktor, Prof., Dr. med.	Berlin N 65, Föhrerstr. 2	Institut Robert Koch
210	Schmidt-Burbach, A.	Dr. med.	Berlin NW., Schiffbauerdamm 3	Med.-diagnost. Institut
211	Schmidt, Hans	Prof., Dr. med.	Marburg/Lahn, Wilhelm-Roser-Str. 34	Institut Emil v. Behring
212	Schmidt-Lange, G. W.	Doz. Dr. med. habil. et phil.	München, Pettenkoferstr. 34	Hygien. Inst. d. Univ.
213	Schmidt, Paul	Prof., Dr. med.	Halle/S., Hindenburgstr. 21	Hygienisches Institut
214	Schreiber, W.	Oberfeldarzt, Dr. med.	Berlin W, Bendlerstr. 35	Reichskriegsministerium
215	Schubert, J.	Dr. med.	Hamburg	Eppendorfer Krankenhaus
216	v. Schuckmann	Reg.-Rat, Dr. med.	Berlin-Dahlem	Königin-Luise-Str. 14
217	Schultze. W. H.	Prof., Dr. med.	Braunschweig	Peter-Joseph-Krahe-Str. 5
218	Schumacher, J.	Abt.-Direktor, Dr. med.	Berlin N 24	Friedrichstr. 122
219	Schumann, P.	Dir., Dr. med. vet.	Breslau 16, Kaiserstr. 55	Tiergesundheitsamt d. Landesbauernschaft Schlesien
220	Schüffner, W.	Prof., Dr. med.	Amsterdam (Holl.)	Mauritskade 57
221	Schütz, F.	Dir., Prof., Dr. med.	Göttingen, Geisstr. 9	Hygienisches Institut
222	Seiffert, G.	Oberstabsarzt, Dr. med.	Nürnberg, Herzog-Bernhard-Str. 136	Hygieniker beim Wehrkreis XIII
223	Seifried, C.	Prof., Dr. med.	München, Veterinärstr. 6	Inst. f. Tierpathologie

Nr.	Name	Amtscharakter	Wohnort	Nähere Adresse
224	Seiser, A.	Dir., Prof., Dr. med.	Gießen, Am Steg 15	Hygienisches Institut
225	Seitz, A.	Prof., Dr. med.	Markleeberg über Leipzig	Wilhelm-Raabe-Str. 4
226	Sell, W.	Dir., Dr. med.	Stettin	Bakt. Untersuchungtstelle des städt. Krankenhauses
227	Selter H.	Dir., Prof., Dr. med.	Bonn/Rhein, Theaterstr. 32	Hygienisches Institut d. Univ.
228	Sonnenschein, K.	Prof., Dr. med.	Hamburg 4, Bernhard-Nocht-Str. 74	Tropeninstitut
229	Spitta	Ober-Reg.-Rat, Prof., Dr. med	Hildesheim	Eulenstr. 1
230	Stahn, Ingeborg	Dr. med.	Bremen, St. Jürgenstr.	Staatl. Hygien. Institut
231	Standfuß	Vet.-Rat., Prof., Dr. med. vet.	Gießen	Inst. f. tierärztl. Nahrungsmittelkunde
232	Steffan	Flottenarzt Dr. med.	Babelsberg-Potsdam	Lortzingstr. 9
233	Stephan, J.	Dr. med.	Frankfurt/Main-Höchst	I. G. Farbenindustrie AG.
234	Stickdorn, W.	Dir., Dr. med. vet.	Landsberg/Warthe	Bakt.- und Seruminstitut
235	Stickl, O.	Dir., Prof., Dr. med.	Tübingen	Hygienisches Institut d. Univ.
236	Stutz, L.	Marinestabsarzt, Dr. med.	Berlin-Zehlendorf	Mörckinger Str. 20
237	Süpfle, K.	Dir., Prof., Dr. med.	Hamburg, Gorch-Fock-Wall 15	Hygienisches Institut
238	Süßmann, Ph. O.	Stadtobermed.-Rat, Prof., Dr. med.	Nürnberg N	Rieterstr. 12
239	Sütterlin, Th.	Dir., Dr. med.	Berlin C, Fischerstr. 39-42	Hauptgesundheitsamt
240	Teutschlaender, O.	Prof., Dr. med.	Mannheim	Städt. Krankenanstalten
241	Tiede	Vet.-Rat, Dr. med. vet.	Köln/Rhein, Liebigstr. 120	Bakt. Institut a. Schlachthof
242	Tietz, C. J.	Oberarzt, Dr. med.	Berlin-Zehlendorf, Badurastr. 5	Hygien. Untersuchungsstelle d. Wehrkreis III
243	Trautwein, K.	Prof., Dr. med. vet.	Freiburg/Br.	Tierhygienisches Institut
244	Uhlenhuth, P.	Geh. Reg.-Rat, Prof., Dr. med.	Freiburg/Br., Hebelstr. 42	Hygien. Inst. d. Univ.
245	Uhlirz, R.	Ober-Med.-Rat, Primarius, Dr. med.	Stockerau bei Wien	Adolf-Hitler-Platz 14
246	Unger	Oberstabsarzt, Dr. med.	Dresden N 6, Antonstr. 5	Wehrkreishygieniker b. Wehrkreis IV
247	Vierthaler, R. W.	Dr. med.	Berlin NW 7, Dorotheenstr. 28a	Hygien. Inst. d. Univ.
248	Wagener, K.	Dir., Prof., Dr. med. vet.	Hannover S	Hygien. Inst. d. Tierärztl. Hochschule
249	Wagner, G.	Dir., Prof., Dr. med.	Danzig, Sandgrube 41	Staatl. Hygienisches Institut
250	Waldhecker, M.	Dr. med.	Berlin NW., Schumannstr.	I. Med. Klinik der Charité
251	Waldmann, O.	Dir., Prof., Dr. med. vet.	Insel Riems/Greifswald	Staatl. Forschungsanstalt
252	Waldmann, A.	Generaloberstabsarzt, Prof., Dr. med.	Berlin W, Bendlerstr. 35	Reichskriegsministerium
253	Walther, K.	Oberfeldarzt, Dr. med. habil.	Leipzig, Danziger Str.	Standortlazarett
254	Wankel	Med.-Rat, Dr. med.	Stettin	Med.-Untersuchungsamt
255	v. Wasielewski	Prof., Dr. med.	Rostock	Im Garten 46
256	Weber, A.	Präsident i. R., Geh. Reg.-Rat, Dr. med.	Berlin NW 7, Unter den Linden 72-74	Reichsministerium des Innern
257	Weichardt, W.,	Prof., Dr. med.	Wiesbaden-Biebrich	Rheinblickstr. 3
258	Weidanz, B.	Ober-Med.-Rat, Dr. med.	Berlin W	Kurfürstenstr. 98
259	Weigmann, F.	Prof., Dr. med.	Innsbruck	Hygienisches Institut

Nr.	Name	Amtscharakter	Wohnort	Nähere Adresse
260	Weiland, P.	Dozent, Dr. med. habil.	Bonn/Rhein, Theaterstr. 32	Hygien. Inst. d. Univ.
261	Wenckebach, G.	Dr. med.	z. Zt. Buenos Aires (Brasilien)	
262	Wendtlandt	Marine-Generalarzt a. D., Dr. med.	Bad Oeynhausen	Labor. f. med. diagnost. Zwecke
263	Weyrauch	Dir., Prof., Dr. med.	Jena, Bismarckstr. 4	Hygien. Inst. d. Univ.
264	Wildführ, Gg.	Abt.-Leiter, Dr. med.	Dresden	Sächs. Serumwerk
265	Winkler	Prof., Dr. med.	Dresden A, Reichsstr. 1	Landesstelle f. öffentl. Gesundheitspflege
266	Witte, J.,	Dir., Prof., Dr. med.	Oppeln (O.-S.)	Gieselstr. 4
267	Wohlfeil, T.	Abt.-Leiter, Prof., Dr. med. habil. et phil.	Berlin N 65, Fohrerstr. 2	Institut Robert Koch
268	Wolf	Prof., Dr. med.	Tübingen	Gartenstr. 81
269	Wolters	Dir., Dr. med. vet.	Dessau, Herzogin-Marie-Platz 3	Hygienisches Institut
270	Wüstenberg, J.	Oberarzt, Dr. med.	Gelsenkirchen, Rotthauserstr. 19	Hygien. Institut d. Ruhrgebietes
271	Zeiss, H.	Dir., Prof. Dr. med.	Berlin NW 7, Dorotheenstr. 28a	Hygienisches Institut d. Univ.
272	Zeißler	Prof., Dr. med.	Altona	Hohenzollernring 29
273	Zeller, H.	Ober-Reg.-Rat, Prof., Dr. med. vet.	Berlin-Dahlem, Unter den Eichen 82—84	Reichsgesundheitsamt
274	Ziegler	Ober-Reg.-Vet.-Rat, Prof. Dr. med. vet.	Dresden, Zirkusstr. 40	Landesveterinäramt
275	Ziemann, H.	Marine-Generalarzt a. D., Prof., Dr. med.	Berlin-Charlottenburg	Mommsenstr. 7
276	Zimmermann, E.	Prof., Dr. med.	Freiburg/Br., Hebelstr. 42	Hygien. Inst. d. Univ.
277	Zschucke	Dozent, Dr. med. habil.	Köln-Mülheim	Düsseldorfer Str. 59

5. Naturwissenschaftliche Sektion.

Nr.	Name	Amtscharakter	Wohnort	Nähere Adresse
1	Baier, K. B.	Dr. phil., wissenschaftl. Mitglied	Gelsenkirchen, Rotthauserstr. 19	Hygienisches Institut des Ruhrgebiets
2	Bavendamm, W.	Prof., Dr.	Tharandt/Dresden, Bismarckstr. 8	Forstbotan. Inst. d. Techn. Hochschule
3	Beatus, R.	Dozent, Dr.	Braunschweig	Bernhard-Rust-Str.
4	Benecke, W.	Prof., Dr.	Münster/Westf., Am Kreuztor 8	Botan. Inst. d. Univ.
5	Bertel, R.	Prof., Dr.	Wien, XVIII	Hildebrandgasse 38
6	Boas, Fr.	Prof., Dr.	München, Fasanenstr. 31	Botan. u. pflanzenpathol. Inst. d. Techn. Hochschule
7	Bortels, H.	Dr. phil.	Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Str. 19	Biologische Reichsanstalt
8	Bucherer, H.	Dr. rer. techn.	Bonn-Immenburg	Botan. Inst. d. Technischen Hochschule
9	Bucksteeg, W.	Dr.	Essen-Stadtwald	Treppenbergstr. 32
10	Burschkies, K.	Dr. chem.	Frankfurt/Main, Ludwig-Rehn-Str. 42—44	Forschungsinstitut für Chemotherapie
11	Demeter, K.	Prof., Dr.	Weihenstephan/München	Südd. Forschungsanstalt für Milchwirtschaft
12	Delitsch, H.	Dr. phil.	Kiel, Kronshagener Weg 5—9	Bakt. Inst. d. Forschungsanstalt für Milchwirtschaft
13	Doll, W.	Abt.-Leiter, Dr.	Kempten/Allgäu	Milchwirtsch. Unters.-Anstalt

Nr.	Name	Amtscharakter	Wohnort	Nähere Adresse
14	Eisenick, L.	Dr.	Weihenstephan/ München	Südd. Forschungsanstalt für Milchwirtschaft
15	Fink, H.	Prof., Dr.	Berlin N 65, Seestr. 13	Institut für Gärungsgewerbe
16	Frey, A.	Dr. chem.	Freising/München	Inst. f. landwirtsch. Technologie
17	Fuhrmann, F.	Prof., Dr. phil.	Graz, Schlögelgasse 9	Techn. Hochschule
18	Girtl, R.	Prof., Dr.	München	Techn. Hochschule
19	Glathe, H.	Prof., Dr.	Leipzig S 3	Dornröschenweg 14
20	Goffarth, H.	Dr.	Kiel	Zweigstelle der Biologischen Reichsanstalt
21	Gorbach, Gg.	n. b. a. o. Prof., Dr.-Ing.	Graz, Schlögelgasse 9	Technische Hochschule
22	Gottsacker, E.	Dr. phil.	Wuppertal-Elberfeld	Bakt. Labor. d. I.G.Farben, Elberfeld
23	Hausam, W.	Dr. phil.	Dresden A 24, Wielandstr. 2	Kaiser-Wilhelm-Institut für Lederforschung
24	Heicken, K.	Dr. phil., beauftragt mit der Leitung d. Chem. Abteilung im Institut Robert Koch	Berlin N 65	Föhrerstr. 2
25	Herbst, W.	Dr. phil. nat.	Geisenheim-Rhg.	Vers.- u. Forsch.-Anst. f. Wein-, Obst- und Gartenbau
26	Heucke, Ruth	Dr. phil.	Berlin N 4, Invalidenstr. 42	Inst. f. Vorratspflege u. landw. Gewerbeforschung d. Univ.
27	Holz, W.	Dr.	Stade/Elbe, Kirchhofstr. 32	Zweigstelle der Biologischen Reichsanstalt
28	Holzweißig, W.	Dipl.-Landwirt	Westerrade über Bad Seegeberg/ Holstein	Radicin Institut f. landw. Bakteriologie
29	Husmann, W.	Dr. ing.	Essen	Emschergenossenschaft
30	Jahn, E.	Prof., Dr.	Hann.-Münden	Forstliche Hochschule
31	Janke, A.	Prof., Dr.	Wien, VI, Getreidemarkt 9	Institut f. technische Biochemie und Mikrobiologie d. Techn. Hochschule
32	Janoschek, A.	Dr. ing.	Weihenstephan/ München	Südd. Forschungsanstalt für Milchwirtschaft
33	Jörg, J.	Dipl.-Landwirt, Dr.	Weihenstephan/ München	Südd. Forschungsanstalt für Milchwirtschaft
34	Kaess, A.	Leiter d. Labor., Dr.	Düsseldorf-Lörich, Bonifaziusstr. 100	Chem.-biolog. Labor. d. Kanal- u. Wasserbauamtes d. Stadt
35	Kaserer, H.	Prof., Dr. phil.	Wien III	Hochschule für Bodenkultur
36	Kausche, A.	Dr. phil.	Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Str. 19	Biologische Reichsanstalt
37	Kersting, Fr.	Dr. phil.	Berlin W 35, Bendlerstr. 37	Referent f. allgem. Biologie im Reichsforschungsrat
38	Klie, H. E.	Apotheker, Dr. phil.	Hamburg, (Woldsenweg 18)	Rathaus-Apotheke
39	Koch, R.	Dozent, Dr. phil. habil.	Berlin N 65, Seestr. 13	Institut für Gärungsgewerbe
40	Köck, G.	Hofrat, Prof., Dr.	Wien III	Hochschule für Bodenkultur
41	Kotte, W.	Oberreg.-Botaniker, Dr.	Augustenberg Amt Karlsruhe	Pflanzenschutzamt Baden
42	Kronberger, M.	Regierungsrat	München, Königinstr. 36	Landesanstalt für Pflanzenbau und -schutz
43	Kubiena, W.	Prof., Dr.	Wien III	Hochschule für Bodenkultur
44	Lagoni, H.	Dr.	Kiel, Kronshagener Weg 5—9	Bakt. Inst. d. Forschungsanst. f. Milchwirtschaft
45	Lehner, Anna	Dr.	München, Königinstr. 36	Landesanstalt für Pflanzenbau und -schutz
46	Lehmann, E.	Prof., Dr.	Tübingen	Botan. Inst. d. Univ.

Nr.	Name	Amtscharakter	Wohnort	Nähere Adresse
47	Lembke, A.	Prof., Dr.	Kiel, Kronshagener Weg 5—9	Bakt. Inst. d. Forschungsanst. für Milchwirtschaft
48	Lieske, R.	Prof., Dr.	Hamburg-Wandsbek	Lübecker Str. 98
49	Lindner, P.	Prof., Dr. phil.	Freiburg/Br.	Jacobistr. 56
50	Maschmann, E.	Prof., Dr. phil.	Frankfurt/Main, Ludwig-Rehn-Str. 42—44	Staatl. Inst. f. exper. Therapie
51	Meewes, K. H.	Dr. phil.	Kiel, Kronshagener Weg 5—9	Bakt. Inst. d. Forschungsanst. f. Milchwirtschaft
52	Mengebier, H.	Dr.	Hildesheim	Labor. d. Molkerei-Zeitung
53	v. Metzen, O.	Dr.	Torfwerk Kendlmühl über Prien (Obb.)	—
54	Meyer, R.	Dr. phil. habil.	Göttingen, Goslerstr. 16	Institut für Mikrobiologie
55	Müller, Heinrich	Dr.	Hamburg, Bei den Kirchhöfen 14	Hamburgisches Institut für angewandte Botanik
56	Müller, Horst	Dr. phil.	Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Str. 19	Biologische Reichsanstalt
57	Müller, Karl Otto	Reg.-Rat, Dr. phil.	Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Str. 19	Biologische Reichsanstalt
58	Noack, K.	Prof., Dr.	Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Str. 1—3	Pflanzenphysiologisches Institut d. Univ.
59	Orth, H.	Dr. phil.	Berlin-Dahlem	Ihnestr. 50
60	Piekarski, G.	Dr. phil.	Berlin-Dahlem, Unter den Eichen 82/84	Erbwissensch. Forschungsanst. d. Reichsgesundheitsamtes
61	Pietschmann, Käthe	Dr. phil.	Göttingen, Goslerstr. 16	Institut für Mikrobiologie
62	Ploberger, Hedwig	Dr. phil.	Weihenstephan/München	Südd. Forschungsanstalt für Milchwirtschaft
63	Raabe, A.	Dr.	Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Str. 19	Biologische Reichsanstalt
64	Rauen, H. M.	Dipl. Chem.	Frankfurt/Main, Ludwig Rehn Str. 42—44	Forschungsistitut f. Chemotherapie
65	Reichenow, E.	Prof., Dr. rer. nat.	Hamburg 4, Bernhard-Nocht-Str. 74	Tropeninstitut
66	Richter, H.	Dr.	Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Str. 19	Biologische Reichsanstalt
67	Rippel, August	Dir., Prof., Dr.	Göttingen, Goslerstr. 16	Institut für Mikrobiologie
68	Rippel, Karl	Dr.	Freiburg/Br.	Weinbau-Institut
69	Roberg, M.	Dozent, Dr. phil. habil.	Breslau	Botanische Anstalten
70	Rodenkirchen, J.	Dr. phil. habil.	Königsberg/Pr., Hans-Sagan-Str. 66	Milchwirtschaftliches Institut d. Universität
71	Rohde, Th.	Forstassessor, Dozent, Dr. habil.	Hersfeld	Stift 8
72	Ruschmann, G.	Prof., Dr.	Landsberg/W., Theaterstr. 25	Institut für Bodenkunde und Pflanzenernährung
73	Scharrer, K.	Dir., Prof., Dr.	Gießen	Agrikulturchem. Inst. d. Univ.
74	Schmalfuß, K.	Dozent, Dr. sc. nat.	Berlin-Dahlem, Lentze-Allee 55—57	Institut für Pflanzenernährung u. Bodenbiologie der Universität

Nr.	Name	Amtscharakter	Wohnort	Nähere Adresse
75	Schmidt, O. C.	Prof., Dr. phil. habil.	Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Str. 6—8	Botanisches Museum
76	Schulze, B.	Dr. phil.	Berlin-Dahlem	Staatl. Materialprüfungsamt
77	Schwartz, W.	Prof., Dr.	Karlsruhe, Kaiserstr. 2	Botanisches-Mikrobiologisches Institut
78	Seelemann, M.	Dir., Prof., Dr. med. vet.	Kiel, Kronshagener Weg 5—9	Institut für Milchhygiene
79	Sierp, Fr.	Chefchemiker, Dr.	Essen-Rellinghausen, St. Annental 55	Chemische Abteilung des Ruhrverbandes Essen
80	Staffe, A.	Prof., Dr.	Wien III	Hochschule für Bodenkultur
81	Stapp, C.	Oberreg.-Rat, Dr. phil.	Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Str. 19	Biologische Reichsanstalt
82	Starck, A.	Dr.	Berlin-Dahlem	Inst. f. gärtner. Pflanzenbau
83	Stille, B.	Dr.	Karlsruhe	Reichsinstitut f. Lebensmittelfrischhaltung
84	Stolze, H.	Margarinefabrikant, Dr. phil.	Berlin N 31	Ackerstr. 63
85	Straib, W.	Dozent, Dr.	Braunschweig-Gliesmarode	Zweigstelle der Biologischen Reichsanstalt
86	Stundl, K.	Dr. phil.	Wien IX, Kinderspitelgasse 15	Hygien. Inst. d. Univ.
87	Teichert, K.	Landsökonomierat, Dr. phil.	Wangen/Allgäu	Bergerhöhe
88	Ullrich, H.	Prof., Dr. phil.	Müncheberg/Mark	Kaiser-Wilhelm-Institut für Züchtungsforschung
89	Viehl, K.	Stadtchemiker, Dr.	Leipzig	Labor. d. Stadtentwässerung Leipzig
90	Zimmermann, W.	Dr. phil.	Breslau, Robert-Koch-Str. 4	Hygienisches Institut
91	Zycha, H.	Dr. phil. habil.	Hann.-Münden	Institut für Botanik u. techn Mykologie

Inhaltsverzeichnis.

Verantwortlich für die Redaktion: Prof. Dr. E. Gildemeister, Berlin-Dahlem, Unter den Eichen 93 II. Verantwortlicher Anzeigenleiter: Hans Schulz, Jena. Verlag und Anzeigenannahme: Gustav Fischer, Jena. D. A. 3. Vj. 1939: 1800. Druck: Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle), Jena/6849. Printed in Germany.

Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten
Erste Abteilung / Originale
144. Band Ausgegeben am 30. August 1939 Heft 6

[Aus dem Veterinärhygienischen und Tierseucheninstitut der Ludwigs-Universität Gießen (Direktor: Prof. Dr. K. Beller).]

Serologische Untersuchungen über die Immunität der Mäuse gegen die lymphozytische Choriomeningitis[1]).

Von Dr. habil. E. Traub und Dr. W. Schäfer.

In früheren Veröffentlichungen (Traub 1936a, 1938) wurden zwei anscheinend verschiedene Arten von Immunität gegen Choriomeningitis bei Mäusen erwähnt, nämlich eine Infektions- und eine sterile Immunität. Die letztere Bezeichnung wählen wir in Fällen, in denen es durch Ueberimpfung von Organmaterial und Blut auf normale Mäuse oder Meerschweinchen nicht gelingt, bei immunen Tieren Virus nachzuweisen. Doch möchten wir damit die Möglichkeit des Vorhandenseins unterinfektiöser Virusmengen im Körper solcher Tiere nicht bestreiten. Es ist noch nicht klar, ob die beiden Immunitätsarten sich qualitativ unterscheiden, oder ob nur quantitative Unterschiede zwischen ihnen insofern bestehen, als bei der Infektionsimmunität große, leicht nachweisbare Virusmengen im Körper vorkommen, bei der sterilen Immunität dagegen nur sehr kleine, nicht feststellbare. Die Infektionsimmunität wird neuerdings, im Gegensatz zu früher, bei allen Mäusen der zu Versuchszwecken gehaltenen infizierten Zuchtkolonie beobachtet (Traub 1939a), die ihre in utero zugezogene Infektion in den meisten Fällen das ganze Leben lang beibehalten und dabei der intrazerebralen Injektion selbst größter Virusmengen widerstehen. Andererseits kann eine sterile Immunität bei Mäusen experimentell erzeugt werden durch Impfung mit einem durch intrazerebrale Mäusepassage veränderten Virusstamm (Traub 1937), der seinen ursprünglichen Viszerotropismus zum größten Teil verloren zu haben scheint, da er Mäuse nur noch nach intrazerebraler Impfung krank macht und nach intraperitonealer, subkutaner oder intravenöser Injektion lediglich eine subklinische, nur vorübergehend nachweisbare Infektion erzeugt. Dieser Infektion folgt eine zunächst hochgradige Immunität, die jedoch an Dauerhaftigkeit der oben erwähnten Infektionsimmunität im allgemeinen nachsteht (Traub 1938). Inwieweit der Verbleib von aktivem Virus im Körper mit der Immunität zusammenhängt, ist noch nicht sicher entschieden. Es hat jedoch zum mindesten den Anschein, als ob er zum Zustandekommen der Immunität nicht unbedingt erforderlich wäre (Traub 1939b).

1) Die Neutralisationsversuche wurden von einem von uns (E. T.) zum größten Teil noch im Rockefeller Institute for Medical Research, Department of Animal and Plant Pathology, Princeton, N. J. (U.S.A.) ausgeführt.

Frühere Untersuchungen über den Mechanismus der Immunität gegen Choriomeningitis zeigten, daß die Immunität der Meerschweinchen nach experimenteller Infektion in der Regel mit der Bildung von humoralen Schutzstoffen einhergeht, die im Neutralisationsversuch leicht nachgewiesen werden können. Dasselbe trifft nach den Untersuchungen anderer Autoren für immune Menschen und Affen zu. Bei immunen Mäusen dagegen gelang der Nachweis neutralisierender Antikörper im Blutserum entweder nicht, oder aber das Ergebnis der Neutralisationsversuche war sehr zweifelhaft, so daß höchstens Spuren von neutralisierenden Antikörpern im Serum vorhanden gewesen sein konnten. Es wurde daher die Vermutung ausgesprochen (Traub 1936a, 1939b), daß die Immunität der Mäuse nicht allein auf der Bildung humoraler Schutzstoffe beruhe, sondern in erster Linie auf eine spezifische Umstimmung der Gewebe zurückzuführen sei, deren Wesen jedoch noch völlig unbekannt ist. Bedson (1937) teilt diese Auffassung nicht. Er sieht vielmehr in den humoralen Antikörpern die alleinigen Träger der Immunität und erklärt den negativen oder zweifelhaften Ausfall der Neutralisationsversuche mit Seren von immunen Mäusen damit, daß die Antistoffe in den Geweben verankert seien und nicht in den Blutstrom abgestoßen werden, ohne jedoch diese Hypothese experimentell zu stützen. Andererseits sprechen sich Webster und Hodes (1938), die die Immunität der Mäuse gegen das Virus der menschlichen Enzephalitis (Typ St. Louis) untersuchten, ebenfalls gegen die humoralen Schutzstoffe als alleinige Immunitätsfaktoren aus. Stuart-Harris und Francis (1938) zeigten in einer Reihe von Versuchen über den Mechanismus der Immunität der Frettchen gegen Influenza, daß der Respirationsapparat dieser Tiere sich während der ersten 2—3 Wochen nach der Erholung in einem refraktären Zustand befindet, der mit spezifischen Antikörpern nichts zu tun hat. Später komme es wahrscheinlich zu einem Gleichgewichtszustand zwischen der Reaktivität des Gewebes und den humoralen Antikörpern. Nach Francis und Stuart-Harris (1938) unterscheidet sich zwar das Epithel der Nasenschleimhaut immuner Frettchen im histologischen Aufbau kaum von dem normaler Frettchen, doch ist ein funktioneller Unterschied zwischen beiden insofern festzustellen, als die Wiederherstellung des Respirationsepithels bei vorbehandelten Tieren wesentlich rascher verläuft als bei unvorbehandelten. Serologische Untersuchungen zur Zeit der Reinfektion, die mindestens 4 Monate nach der Erstinfektion vorgenommen wurde, ließen Beziehungen zwischen dem Antikörpergehalt des Serums und dem Immunitätsgrad erkennen. Der letztere ist nach Ansicht der Verfasser ein Produkt der humoralen Schutzstoffe und der Geschwindigkeit des Heilungsprozesses im Respirationsepithel.

Die Ansichten über den Mechanismus der Virusimmunität, der bei verschiedenen Viruskrankheiten und verschiedenen Tierarten vielleicht gewisse Unterschiede aufweist, sind also noch sehr widerspruchsvoll, und weitere Untersuchungen sind dringend geboten.

In der vorliegenden Arbeit wird vor allem die Frage geprüft, ob es bei Mäusen überhaupt gelingt, spezifische Antikörper gegen das Choriomeningitisvirus in sicher nachweisbaren Mengen zu erzeugen, oder ob der Erreger bei Mäusen nicht im üblichen Sinne antigen wirkt. Dieser Frage wurde insofern besondere Beachtung geschenkt, als die Möglichkeit besteht, daß es sich beim Choriomeningitisvirus um ein umgewandeltes Mäuseprotein handelt, das pathogene Eigenschaften angenommen hat und keine Antigenität für Mäuse besitzt. Berechtigt ist diese Mutmaßung insofern, als es bis jetzt trotz aller Bemühungen nicht gelungen ist, die Infektionsquelle der infizierten Mäusekolonie festzustellen. Zunächst wurde eine Reihe von Seren bzw. Gewebsextrakten von Mäusen mit steriler oder Infektionsimmunität auf neutralisierende Antikörper, also eigent-

liche Schutzstoffe, untersucht. Ferner wurden Komplementbindungs- und Präzipitationsversuche mit solchen Seren angestellt und das Neutralisationsvermögen gewisser Seren mit ihrem Gehalt an komplementbindenden Antikörpern verglichen.

Neutralisationsversuche.

Zur Bestimmung des Gehalts an neutralisierenden Antikörpern von Seren oder Gewebsextrakten wurden 3 Methoden herangezogen, die im folgenden näher beschrieben werden sollen.

Nach dem ersten, schon früher ausführlich beschriebenen Verfahren (Traub 1936a) werden die Gemische von Serum und Virus Meerschweinchen mit einem Durchschnittsgewicht von 300 bis 350 g subkutan in die Planten injiziert. Als Virus wird dabei ein Meerschweinchenpassagestamm (Traub 1937) verwendet, der für diese Tiere stark virulent ist. Die überstehende Flüssigkeit einer leicht zentrifugierten 10proz. Aufschwemmung von virushaltigem Meerschweinchengehirn wird nach Zehner- oder Fünferpotenzen in physiologischer Kochsalzlösung so stark verdünnt, daß der Titrationsendpunkt sicher überschritten wird. Die passenden Verdünnungen werden in einem bestimmten, in den Tabellen angegebenen Verhältnis mit unverdünntem Serum oder Gewebsextrakt gemischt, eine Zeitlang (s. Tabellen) stehen gelassen und dann auf Meerschweinchen plantar verimpft, wobei die Impfdosis sich nach der vorhandenen Menge des zu prüfenden Serums bzw. Extraktes richtet. Die Körpertemperatur der Tiere wird vom 4. bis 14. Tage p. i. täglich gemessen und die Uebertragung des Erregers durch das Thermometer dabei peinlich vermieden. Nach Ablauf von 3 Wochen werden die nicht erkrankten Meerschweinchen durch plantare Nachimpfung mit Virus auf Immunität geprüft. Dabei sind Tiere, die nach der ersten Impfung nicht erkrankten, sehr selten immun.

Nach der zweiten Methode werden in gleicher Weise hergestellte Gemische von Serum bzw. Extrakt und Mäusepassagevirus in Mengen von 0,05 ccm intrazerebral auf etwa 5 Wochen alte Mäuse aus der virusfreien Zucht (Traub 1936b) verimpft. Als Virusaufschwemmung dient die überstehende Flüssigkeit einer leicht zentrifugierten 10proz. Suspension von infiziertem Mäusegehirn in Bouillon-Kochsalzlösung (1 : 2). Die geimpften Mäuse werden 2 Wochen lang beobachtet und die überlebenden Tiere durch intrazerebrale Impfung mit 0,05 ccm einer 1proz. Aufschwemmung von infiziertem Mäusegehirn auf Immunität geprüft. Es folgt dann eine nochmalige zweiwöchige Beobachtungszeit, nach der die immunen Tiere beseitigt werden. Bei Verwendung von Immunseren von Meerschweinchen ist die erste Methode etwa 10mal empfindlicher als die zweite.

Das dritte Verfahren, die passive Immunisierung von Mäusen, ist das am wenigsten empfindliche, da es selbst bei Verwendung von Meerschweinchenseren mit sehr starkem Antikörpergehalt selten gelingt, die Krankheit völlig zu verhindern. Deswegen wurde diese Methode weniger häufig als die beiden anderen angewandt. 5 Wochen alte Mäuse erhalten dabei 0,3 ccm des zu untersuchenden Serums intravenös und einige Zeit später (s. Tabelle V) 0,05 ccm verschiedener Virusverdünnungen intrazerebral. Die Beobachtungszeit und Prüfung der überlebenden Tiere auf Immunität sind dieselben wie bei der zweiten Methode.

Die zu untersuchenden Seren wurden von Mäusen durch Herzpunktion gewonnen. Dabei gelingt es bei einiger Uebung nicht selten, von einer einzigen erwachsenen Maus 1 ccm Serum zu erhalten. Bei den zu Neutralisationsversuchen verwendeten Seren handelte es sich ausnahmslos um Gemische der Seren mehrerer, auf gleiche Art immunisierter bzw. normaler Mäuse.

Die auf Antikörpergehalt geprüften Gewebsextrakte wurden auf folgende Weise hergestellt: Von den betreffenden Organen mehrerer, in der gleichen Weise immunisierter bzw. normaler Mäuse wurden 30proz. Suspensionen in Kochsalzlösung hergestellt, ½ Std. in den Kühlschrank gestellt und dann ½ Std. lang bei etwa 2000 U.p.M. zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde abpipettiert und durch die gleiche Menge Kochsalzlösung ersetzt. Nach Zusatz von sterilen Glasperlen wurde der Bodensatz aufgeschüttelt und die Suspension über Nacht im Schüttelapparat im Kühlraum geschüttelt. Dann wurde nochmals wie zuvor zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde mit dem Ueberstand des Vortages gemischt und das Gemisch dann sofort im Neutralisationsversuch geprüft. Das in Tabelle IV aufgeführte Gehirnextrakt Nr. III stellte in Wirklichkeit kein Extrakt dar, sondern eine 25proz. Gehirnsuspension, die zuvor 2 Tage im Kühlschrank gestanden hatte.

Die Art der Immunisierung der serumspendenden Mäuse wird in der folgenden Liste kurz angegeben. Dabei bezeichnet die Abkürzung „MB" den bereits mehrfach erwähnten Mäusepassagestamm B (Traub 1937) und die nachfolgende Zahl die Anzahl der intrazerebralen Mäusepassagen, die der Stamm damals durchgemacht hatte. Zur Impfung dienten in der Regel etwa 10proz. Aufschwemmungen von frischem Mäusegehirn in Kochsalzlösung. Abweichungen von diesem Verfahren werden besonders vermerkt. Nach intraperitonealer Impfung mit diesem Virus ist das Blut am 6. Tage p. i. bei etwa 60 Proz. der geimpften Mäuse schwach

virulent. Am 8. Tage war bei einer Reihe von untersuchten Mäusen bereits kein Virus mehr im Blute nachzuweisen, und nach der zweiten Woche gelang der Virusnachweis im Blut und in den Organen ausnahmslos nicht mehr. Mäuse, die intraperitoneal oder subkutan vorbehandelt und dann intrazerebral nachgeimpft werden, erwerben eine sehr hochgradige Immunität. Dennoch wurden in einigen Fällen noch weitere Impfungen vorgenommen, um den Antikörpergehalt des Serums nach Möglichkeit zu steigern.

Immunserum I: Gewonnen von 2 hochgradig immunen Mäusen mit avirulentem Blut aus der infizierten Kolonie (damals gab es dort noch derartige Mäuse). Das eine Tier wurde am 11. 11. 35 aus der Kolonie entfernt, als sein Blut und Nasensekret nicht mehr infektiös waren, der Urin aber noch Virus enthielt. Nachimpfungen: MB 15, 0,05 ccm iz. am 9. 3. 36; MB 18, 0,05 ccm iz. am 19. 6. 36; MB 20, 0,5 ccm ip. am 3. 7. 36. Blutentnahme am 19. 6. 36 und 18. 7. 36. Beide Blutproben avirulent. Die 2. Maus wurde am 19. 6. 36 in den Versuch genommen. Blut, Urin und Nasensekret avirulent. Nachimpfungen: MB 18, 0,05 ccm iz. am 19. 6. 36; MB 20, 0,5 ccm ip. am 8. 7. 36. Blutentnahme am 19. 6. 36 und 18. 7. 36. Beide Blutproben avirulent. Die 4 Serumproben von den beiden Mäusen wurden vor dem Neutralisationsversuch gemischt [1]).

Immunserum II: Gewonnen von 14 wie folgt immunisierten Mäusen aus der virusfreien Zucht: MB 24, 0,2 ccm sk. am 4. 9. 36; MB 24, 0,05 ccm iz. am 12. 9. 36; MB 25, 0,05 ccm iz. am 21. 9. 36; MB 26, 0,5 ccm ip. am 30. 9. 36. Blut jeder Maus virusfrei am 15. 10. 36. Entblutet am 5. 11. 36.

Immunserum III: Gewonnen von 8 Mäusen aus der virusfreien Zucht, die zunächst mit einem Formolimpfstoff aus infiziertem Gehirn-, Lungen-, Leber- und Nierengewebe von Mäusen, wie folgt, behandelt wurden: je 0,25 ccm im. und 0,5 ccm ip. am 4., 14. und 24. 8. 36. Nachimpfung mit MB 16, $0{,}05 \times 10^{-3}$ ccm iz. am 29. 9. 36. Alle Mäuse erkrankten typisch 6—8 Tage später, erholten sich aber, während die Kontrollen starben. Entblutet am 5. 11. 36.

Immunserum IV: Gewonnen von 6 derselben Mäuse, die IS. II lieferten. Diese, die Blutentnahme am 5. 11. 36 überlebenden Tiere wurden am 6. 11. 36 mit MB 28 (0,05 ccm iz.) nachgeimpft. Blutentnahme am 27. 11. 36.

Immunserum V stammte von 6 Mäusen. Immunisierung: 0,2 ccm Ueberstand einer Lebersuspension von einer natürlich infizierten Maus iv. am 16. 9. 36. MB 26, 1 ccm ip. am 30. 9. 36. MB 28, 0,05 ccm iz. am 6. 11. 36. Entblutet am 17. 11. 36.

Immunserum VI: Gewonnen von 8 Mäusen, denen am 17. 11. 36 0,25 ccm MB 29 sk. injiziert wurden. Gleichzeitig wurden 8 weitere Mäuse als Kontrollen geimpft, die am 17. 12. 36 durch iz. Impfung mit 0,05 ccm MB 30 auf Immunität geprüft wurden und dieser Nachimpfung symptomlos widerstanden. Blutentnahme bei den erstgenannten Tieren am 17. 12. 36. Von ihren Gehirnen wurde Gehirnextrakt I hergestellt.

Immunserum VII wurde von den eben erwähnten iz. nachgeimpften Kontrollmäusen gewonnen, die am 14. 1. 37 entblutet wurden.

Immunserum VIII stammte von 8 Mäusen, die am 28. 12. 38 mit 0,3 ccm MB 30 sk. geimpft wurden. Blutentnahme am 27. 1. 37. Die Gehirne und Lebern dieser Tiere wurden zu Gehirnextrakt II bzw. Leberextrakt I verarbeitet.

Immunserum IX: Gewonnen von 15 Mäusen, die am 19. 10. 38 im Alter von 5 Wochen mit 0,05 ccm Serum von Mäusen aus der infizierten Zucht intranasal geimpft wurden. 1. Nachimpfung: MB 42, 0,05 ccm iz. am 7. 1. 38. Nach dieser Impfung zeigten einige Tiere eine allergische Reaktion (Traub 1938). 2. Nachimpfung: MB 43, 0,05 ccm iz. am 17. 1. 38, nach der keinerlei Krankheitserscheinungen beobachtet wurden. Entblutet am 7. 2. 38.

Immunserum X stammte von 10 ausgewachsenen Mäusen aus der infizierten Kolonie. Entblutet am 23. 3. 38. Sammelserum bei intrazerebraler Impfung stark virulent. Zur Inaktivierung des Virus wurde das Serum ½ Std. lang bei 56° C im Wasserbad erwärmt. Eine solche Erwärmung inaktiviert die neutralisierenden Antikörper in Meerschweinchen-Immunserum nicht.

Immunserum XI wurde von 6 Mäusen geliefert, die wie folgt vorbehandelt wurden: MB 43, 1 ccm ip. am 26. 1. 38; MB 43, 0,05 ccm iz. am 1. 2. 38; MB 44, 0,05 ccm iz. am 15. 2. 38. Entblutet am 22. 3. 38. Eine 25proz. Gehirnsuspension dieser Mäuse (s. oben) wurde ebenfalls im Neutralisationsversuch geprüft.

Immunserum XII stammte von 16 Mäusen, von denen 14 wie folgt immunisiert wurden: MB 54, 0,5 ccm ip. am 19. 12. 38; MB 55, 0,05 ccm iz. und 0,5 ccm ip. am 28. 12. 38; MB 56, 1 ccm ip. am 4. 1. 39. Immunisierung der 2 restlichen Tiere: MB 55, 0,5 ccm ip. am 28. 12. 38; MB 56, 0,05 ccm iz., 1 ccm ip. und 0,5 ccm sk. am 4. 1. 39. Sämtliche Mäuse ertrugen die iz. Nachimpfungen symptomlos, was überhaupt für alle hier aufgeführten Tiere zutrifft. Blutentnahme am 18. 1. 39.

1) Für die verschiedenen Impfmethoden werden folgende Abkürzungen gebraucht: iz. = intrazerebral; ip. = intraperitoneal; sk. = subkutan; im. = intramuskulär; iv. = intravenös.

Immunserum XIII: Gewonnen von 10 Mäusen, die am 11. 1. 39 mit 1 ccm MB 57 ip. geimpft wurden. Entblutet am 19. 1. 39.

Sämtliche Mauseseren wurden vor Gebrauch auf Meerschweinchen bzw. Mause iz. verimpft, um sicher zu sein, daß sie kein Virus enthielten, das den Ausfall der Neutralisationsversuche hätte stören konnen. Die Immunseren XII und XIII wurden, obwohl sie sich bei iz. Verimpfung auf Mäuse als virusfrei erwiesen, ½ Std. lang bei 56° C erhitzt, da sie auch zu Komplementbindungsversuchen verwendet wurden.

Die als Kontrollen dienenden normalen Mäuseseren (in den Tabellen kurz mit „NS.“ bezeichnet) stammten von unvorbehandelten Tieren etwa gleichen Alters wie die immunen Mäuse, mit Ausnahme der Kontrollseren für die IS. VI, VII und VIII, die von Mäusen gewonnen wurden, die in gleicher Weise mit normalem Mäusegehirn vorbehandelt wurden wie die immunisierten Tiere mit infiziertem. Die beiden zu Vergleichszwecken benützten Immunseren von Meerschweinchen stammten von wiederholt mit virulentem Meerschweinchenmaterial geimpften Tieren, während die Spendertiere der Meerschweinchen-Normalseren nicht vorbehandelt waren.

Im 10. Versuch (Tabelle II) wurde zu Vergleichszwecken ein Sammelserum von 6 Mäusen geprüft, die 24 Std. vor der Blutentnahme mit je 0,3 ccm Hochimmunserum von Meerschweinchen (IS. I + II Mschw., āā) intravenös geimpft worden waren.

Tabelle I.
Neutralisationsversuche mit Immunseren von Mäusen.
(Plantare Impfung von Meerschweinchen.)

Versuchsnummer und Datum	Bebrütungszeit der Gemische	Gehalt der Gemische an		Serum	Ergebnisse der plantaren Impfung von Meerschweinchen mit den Gemischen von Serum und Virus			
		Serum	Virusverdünnung		Virusverdünnungen			
		ccm	ccm		10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
1 24. 7. 36	½ St. Z.T.	0,25	0,25	I.S. I		+	+	—
				N.S.		+	+	—
2 28. 7. 36	½ St. Z.T. 6 Tg. K.S.	0,15	0,15	I.S. I	+	+	—	—
				N.S.	+	+	—	—
3 24. 11. 36	½ St. Z.T.	0,25	0,25	I.S. II		+	+	—
				I.S. III		+	+	—
				N.S.		+	+	—
				N.S. von Meerschw.		+	+	—
4 11. 12. 36	½ St. Z.T.	0,25	0,25	I.S. IV		+	+	—
				N.S.		+	+	—

Abkürzungen: Z.T. = Zimmertemperatur; K.S. = Kühlschrank; I.S. = Immunserum; N.S. = Normalserum; + = Meerschweinchen starb an Choriomeningitis oder wurde in schwer krankem Zustand getötet; — = Meerschweinchen zeigte keine Krankheitserscheinungen und erwarb keine Immunität gegen Nachinfektion.

Die Ergebnisse der Neutralisationsversuche, die einer weiteren Erklärung kaum bedürfen, sind in den Tabellen I bis V zusammengefaßt.

Die in Tabelle I aufgeführten Neutralisationsversuche mit den Seren I bis IV lieferten überraschend gleichmäßige, negative Ergebnisse, wobei die Dauer der Einwirkung des Serums auf das Virus vor der Verimpfung der Gemische keinen Einfluß auf den Ausfall des Versuchs hatte (vgl. Versuche 1 und 2, die mit denselben Seren und demselben Virus angestellt wurden).

Zu Tabelle II ist zunächst zu bemerken, daß sehr kleine Virusmengen bei Mäusen auch nach intrazerebraler Injektion häufig eine subklinische Infektion erzeugen, der eine hochgradige Immunität folgt. Aus diesem Grunde wurden die überlebenden Tiere in der oben angegebenen Weise auf Immunität geprüft und der Ausfall der Immunitätsprüfung bei der Beurteilung der Ergebnisse

Tabelle II.
Neutralisationsversuche mit Immunseren von Mäusen und Meerschweinchen. (Intrazerebrale Impfung von Mäusen.)

Versuchs-nummer und Datum	Be-brütungs-zeit der Gemische	Verhältnis von Serum : Virus in den Gemischen	Serum	Ergebnisse der intrazerebralen Impfung von Mäusen mit den Gemischen von Serum und Virus					
				Virusverdünnungen					
				10^{0}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
5 7. 11. 36	½ St. Z.T.	2 : 1	I.S. II			++	∓∓	∓–	––
			I.S. III			++	+∓	∓–	∓–
			N.S.			++	++	+–	––
6 21. 11. 36	½ St. Z.T.	1 : 1	I.S. II			+++	+∓∓	–––	–––
			I.S. III			+++	++–	+––	–––
			N.S.			+++	++∓	–––	–––
			N.S. Meer-schw. *			+++	++∓	–––	–––
7 1. 12. 36	½ St. Z.T. 2 St. K.S.	1 : 1	I.S. IV		++	∓∓	––	––	
			I.S. V		++	++	––	+–	
			N.S.		++	++	∓–	––	
8 11. 12. 36	½ St. Z.T.	2 : 1	I.S. IV		+++	+++	+––	–––	–––
			N.S.		+++	+++	+±–	∓––	–––
9 5. 2. 37	½ St. Z.T.	1 : 1	I.S. I Meerschw.	++–	+––	–––	–––	–––	
			I.S. II Meerschw.	∓––	–––	–––	–––	–––	
			N.S. Meerschw.	+++	+++	+++	+++	–––	
10 25. 2. 37	½ St. Z.T.	1 : 1	von 6 passiv immunisierten Mäusen			–––	+––		
			N.S.			+++	+++		

Zeichenerklärung: + = Maus starb in typischen Krämpfen in der üblichen Zeit; ± = Maus zeigte charakteristische Erscheinungen und erholte sich; ∓ = Maus zeigte keine deutlichen klinischen Symptome, war aber immun gegen intrazerebrale Nachimpfung; — = Maus zeigte keine Krankheitserscheinungen und erwarb keine Immunität gegen intrazerebrale Nachinfektion; * = Meerschweinchen-Normalserum.

der Neutralisationsversuche in Betracht gezogen. Bei früheren Versuchen mit Meerschweinchen-Immunseren wurde nämlich die Erfahrung gemacht, daß Mäuse, denen ein vollkommen neutrales Gemisch von Immunserum und Virus intrazerebral eingespritzt wird, keine Immunität erwerben. Zwei solcher Versuche (Nr. 9 und 10) wurden in Tabelle II aufgenommen. Es ist daher anzunehmen, daß die durch intrazerebrale Impfung mit einem Gemisch von Virus und Mäuseimmunserum resistent gewordenen Mäuse in Wirklichkeit eine Spur von unvollständig neutralisiertem Virus verabreicht erhielten.

Die Beurteilung der Ergebnisse der Neutralisationsversuche ist trotzdem nicht einfach. Im ersten Versuch (Nr. 5) mit den Immunseren II und III schien es, als ob diese ein geringes Neutralisationsvermögen besäßen. Im zweiten Versuch (Nr. 6) dagegen war die Schutzwirkung weniger deutlich. Zieht man dann noch den negativen Ausfall des Meerschweinchenversuchs (Tabelle I) hinzu, so kommt man zu dem Schluß, daß den beiden Seren höchstens ganz minimale neutralisierende Eigenschaften zukamen. Aehnliches ist über IS. IV zu sagen, wenn dieses auch in beiden Mäuseversuchen eine geringe neutrali-

sierende Wirkung zu haben schien. Dem Immunserum V dagegen fehlte diese vollkommen.

Die beiden Hochimmunseren von Meerschweinchen hatten eine sehr starke schützende Wirkung, was auch für das Sammelserum von den 6 mit Meerschweinchen-Hochimmunserum passiv immunisierten Mäusen zutrifft.

Tabelle III.
Neutralisationsversuche mit Seren und Gewebsextrakten von immunen Mäusen.
(Intrazerebrale Impfung von Mäusen.)

Versuchsnummer und Datum	Bebrütungszeit der Gemische	Verhältnis von Serum bzw. Extrakt: Virus	Geprüftes Material	Ergebnisse der intrazerebralen Impfung von Mäusen mit den Gemischen von Serum bzw. Extrakt und Virus									
				Virusverdünnungen									
				5^0	5^{-1}	5^{-2}	5^{-3}	5^{-4}	5^{-5}	5^{-6}	5^{-7}	5^{-8}	5^{-9}
11 18.12.36	½ St.Z.T.	2:1	I.S. VI	+++	+++	+++	+±∓	∓−−	−−−	−−−			
			N.S.	+++	+++	+++	++∓	++∓	−−?*	−−−			
			Geh.E. I	+++	+++	++±	∓−−	−−?	−−−	−−?			
			Norm. Geh.E.	+++	+++	+++	−−−	−−−	−−−	−−−			
28.12.36	½ St.Z.T. 10 Tg.K.S.	2:1	I.S. VI		+++	++∓	−−−	−−−					
			N.S.		++∓	−−−	+−−	+−−					
12 28. 1. 37	2 St.Z.T.	2:1	I.S. VII			+++	+++	+++	+−−	−−−	∓−−		
			I.S. VIII			+++	+++	++∓	∓−−	−−−	−−−		
			N.S.			+++	+++	++−	+∓−	−−−	−−−		
			Geh.E. II		+++	+++	+++	+++	∓−−	−−−			
			Norm. Geh.E.		+++	+++	+++	++∓	∓∓−	+−−			
			Leb.E. I		+++	+++	+++	+∓−	∓−−	∓−−			
			Norm. Leb.E.		+++	+++	+++	∓∓∓	+∓−	∓−−			
13 3. 3. 38	½ St.Z.T. 3½ St.K.S.	1:1	I.S. IX				+++	+++	+∓∓	∓−−	−−−	−−−	
			N.S.				+++	+++	+∓−	∓−−	−−−	−−−	
14 23. 1. 39	½ St.Z.T. 1 St. K.S.	1:1	I.S. XII				+++	+++	++±	+?−	−−−	−−−	−−−
			I.S. XIII				+++	++±	++±	∓−−	−−−	−−−	−−−
			N.S.				+++	+++	++±	∓∓−	∓−−	−−−	−−−

* ? = Maus zeigte keine Krankheitserscheinungen und starb durch Verletzung bei der intrazerebralen Nachimpfung.

Um nach Möglichkeit klarer geschnittene Resultate zu erhalten, wurde das Virus in den folgenden Versuchen nach Fünferpotenzen verdünnt (Tab. III). Trotzdem wurden aber die Ergebnisse nicht eindeutiger. Die Zeit des Stehens der Gemische vor der Verimpfung war wiederum ohne Einfluß auf den Ausfall des Versuchs (s. Versuch 11). Auch den Gewebsextrakten schien eine bestimmte neutralisierende Wirkung nicht zuzukommen.

Schließlich wurden noch einige Neutralisationsversuche mit Meerschweinchen angestellt. Die Gemische von Virus und Serum wurden jeweils eine ½ Std. bei Zimmertemperatur gehalten, ehe sie plantar verimpft wurden. Wie Tabelle IV zeigt, war bei Immunserum IX eine schwache neutralisierende Wirkung festzustellen. Dagegen ergab dieses Serum im Mäuseversuch (Nr. 13, Tabelle III) keinerlei Neutralisation. Die übrigen Immunseren ließen schützende Eigenschaften vermissen. Bei dem in der Tabelle mit * bezeichneten Kontrollmeerschweinchen (Versuch 16), das nach erheblich verlängerter Inkubationsfrist erkrankte, handelte es sich wahrscheinlich um ein Tier mit außergewöhnlich hoher Empfänglichkeit, wie sie unter Meerschweinchen in Ausnahmefällen

Tabelle IV.
Neutralisationsversuche mit Seren und einer Gehirnaufschwemmung von immunen Mäusen.
(Plantare Impfung von Meerschweinchen.)

Versuchsnummer und Datum	Gehalt der Gemische an		Geprüftes Material	Ergebnisse der plantaren Impfung von Meerschweinchen mit den Gemischen von Serum bzw. Suspension und Virus						
	Serum bzw. Gehirnaufschwemmung ccm	Virus ccm		Virusverdunnungen						
				5^{-4}	5^{-5}	5^{-6}	5^{-7}	5^{-8}	5^{-9}	5^{-10}
15 3. 3. 38	0,15	0,15	I.S. IX	++	++	−−	−−	−−		
			N.S.	++	++	++	−−	−−		
16 24. 3. 38	0,2	0,1	I.S. X	+	+	−	−	−	−	
			I.S. XI	+	+	−	−	−	−	
			N.S.	+	+	−	+*	−	−	
			Geh.Susp. III	+	+	+	−	−	−	
			Norm. Geh.Susp.	+	+	−	−	−	−	
17 23. 1. 39	0,25	0,25	I.S. XII	++	++	++	++	++	+−	
			I.S. XIII	++	++	++	++	+−	−−	
			N.S.	++	++	++	++	−−	−−	
31. 1. 39	0,15	0,15	I.S. XII			++	++	++	−−	−−
			N.S.			++	++	++	−−	−−

* Erkrankt nach verlängerter Inkubationszeit.

angetroffen wird. Den in dem betreffenden Versuch geprüften Immunseren X und XI können deswegen neutralisierende Eigenschaften kaum zugesprochen werden, zumal da in beiden Fällen dieselbe Virustitergrenze festgestellt wurde wie im Kontrollversuch mit normaler Gehirnsuspension.

Die Gehirnaufschwemmung (Versuch 16) besaß keine neutralisierende Wirkung.

In Tabelle V sind zwei Versuche über die passive Immunisierung von Mäusen mit Mäuseimmunseren wiedergegeben, in denen beide Seren eine schützende Wirkung vermissen ließen. Das eine Serum (IS. IX) schien die

Tabelle V.
Versuche über passive Immunisierung von Mäusen mit Hochimmunserum von Mäusen und Meerschweinchen.

Versuchsnummer und Datum	Zeit zwischen iv. Serum- und iz. Virusimpfung Stunden	Serum	Ergebnisse der intrazerebralen Nachimpfung mit Virus			
			Virusverdünnungen			
			10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
18 21. 11. 36	1/2—1	I.S. II	+++	+∓∓	−−−	
		N.S.	+++	++∓	−−−	
19 12. 4. 38	4	I.S. IX	++++	+++	+∓∓	−−−
		N.S.	+++±	++∓	−−−	−−−
20 13./14. 2. 37	1	I.S. I Mschw.	±±±	+−	−−	
		I.S. II Mschw.	++±	+∓	+−	
		N.S. Mschw.	+++	++	−−	
	24	I.S. I Mschw.	++±	±±	−−	
		I.S. II Mschw.	+±±	±∓	−−	
		N.S. Mschw.	+++	+∓	−−	

Empfänglichkeit der Tiere sogar zu steigern, obwohl es im Neutralisationsversuch an Meerschweinchen (Tabelle IV) eine geringe Schutzkraft zu haben schien. Zum Vergleich ist noch ein Versuch mit 2 Hochimmunseren von Meerschweinchen angeführt, die in vitro stark neutralisierten (s. Tabelle III), in vivo jedoch viel weniger wirksam waren.

Komplementbindungsversuche.

Bei den in der Hauptsache von W. Sch. ausgeführten Komplementbindungsversuchen wurden gleichbleibende Serum- und Komplementmengen an fallenden Antigenmengen geprüft.

Technik. — Das hämolytische System besteht aus einer 4proz. Aufschwemmung gewaschener Hammelblutkörperchen in physiologischer Kochsalzlosung, der die gleiche Menge einer Ambozeptorverdünnung zugesetzt wird, die pro ccm 12 Ambozeptoreinheiten enthält. Der Ambozeptor wurde selbst hergestellt und durch Zusatz von 0,5proz. Karbolsäure konserviert.

Das Komplement wurde nach der Methode von Witte (1933) und Wagner (1937) konserviert, und zwar wird dabei frisches Meerschweinchenserum mit folgender Lösung (ää) versetzt: Acid. boric. 2,0; Kal. sulfuric. 5,0; Aqua dest. 50,0. Bei der Komplementauswertung werden zu steigenden Komplementmengen (0,05; 0,1 usf. bis 0,5 ccm) je 2 ccm des hämolytischen Systems gegeben und der Inhalt jedes Röhrchens mit physiol. Kochsalzlösung auf 4,5 ccm ergänzt. Nachdem die Gemische 20 Min. lang im Wasserbad von 38° C gestanden haben, wird das Ergebnis abgelesen. Als Komplementeinheit (MLD.) wird die Komplementmenge bezeichnet, die eben noch vollkommene Hämolyse erzeugt.

Im Hauptversuch werden 6 Röhrchen mit je 0,1 ccm des zu untersuchenden Serums beschickt. Dann werden 0,05 bis 0,5 ccm Antigen sowie 1—2 Komplementeinheiten zugesetzt und der Inhalt jedes Röhrchens mit Kochsalzlösung auf 1,25 ccm ergänzt. Die Antigenkontrollen, die in den folgenden Tabellen nicht vermerkt sind, bestehen aus 6 Röhrchen mit denselben fallenden Antigenmengen + Komplement + Kochsalzlösung ad 1,25 ccm. Da in den meisten Versuchen nur geringe Serummengen zur Verfügung standen, mußte die vollständige Auswertung des Antigens unterbleiben. Zuweilen konnte nur eine einzige Antigendosis geprüft werden. Als Serumkontrolle dient ein Röhrchen mit 0,1 ccm Serum + Komplement + Kochsalzlösung ad 1,25 ccm. Ferner wird noch eine Antigenkontrolle ohne Komplement und Serum eingeschaltet, um sich zu versichern, daß das Antigen keine hämolytischen Eigenschaften besitzt. Entsprechende Gemische, jedoch ohne die Antigenkontrollen, werden mit Normalserum angesetzt. Die Gemische werden 20 Min. lang im Wasserbad von 38° C gehalten und dann mit je 1 ccm des hämolytischen Systems unter kräftigem Schütteln versetzt. Nach einer weiteren Bebrütungszeit von 20 Min. wird die Reaktion abgelesen. Die zweite, endgültige Ablesung erfolgt am nächsten Morgen, nachdem die Gemische über Nacht im Laboratorium gestanden haben. Die Reaktion wird je nach dem Grad der Hemmung der Hämolyse mit + bis +++ bezeichnet.

Bereitung des Antigens. — Es zeigte sich bald, daß das Gelingen der Komplementbindungsprobe von der Art und Zubereitung des Antigens abhängt. Hochwirksame Antigene konnten fast regelmäßig aus der Leber infizierter Meerschweinchen hergestellt werden. Etwas weniger wirksam waren Antigene aus den hepatisierten Teilen der Lungen, während Gehirn- und Nierenextrakte sich als unbrauchbar erwiesen. Die zur Antigengewinnung benutzten Meerschweinchen wurden plantar mit Meerschweinchenpassagevirus geimpft. Die Leber wurde unmittelbar nach dem Tod entfernt und unter Zusatz von Kochsalzlösung (1:10) mit Sand zerrieben. Die Aufschwemmung blieb über Nacht im Kühlschrank bei + 2° C stehen und wurde am nächsten Morgen bei 4000 U.p.M. 20 Min. lang zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit diente das Antigen.

Ein ebenso wirksames, für uns einfacher und billiger zu beschaffendes Antigen haben wir später aus den Embryonen von Mäusen der infizierten Zuchtkolonie hergestellt, die in der Regel sehr viel Virus enthalten (Traub 1936b). Fünf solcher Antigene wurden geprüft und waren ausnahmslos wirksam. Die trächtigen Tiere wurden zwecks Serumgewinnung in tiefer Aethernarkose entblutet und die in Kochsalzlösung gewaschenen Embryonen mit Sand unter Zusatz von Kochsalzlösung (5 ccm pro Embryo im Alter von 14—20 Tagen; bei kleineren Embryonen entsprechend weniger) zerrieben. Die Suspension blieb über Nacht im Kühlschrank und wurde am nächsten Morgen bei 4000 U.p.M. 20 Min. lang zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit diente als Antigen. Zum Nachweis des Virus wurden die Antigene in Mengen von $0{,}05 \times 10^{-3}$ ccm intrazerebral auf Mäuse verimpft, bei denen die Infektion ausnahmslos anging. Die Antigene bewahrten ihre Wirksamkeit im Kühlschrank etwa 2—3 Wochen lang, einzelne sogar noch länger.

Komplementbindungsversuche mit Meerschweinchenseren.

Da Immunseren von Meerschweinchen in der Regel neutralisierende Antikörper enthalten, stellten wir zunächst mit solchen Seren die Komplementbindungsprobe an. Insgesamt prüften wir 17 Immun- und 20 negative Seren, die vor dem Versuch ½ Std. lang bei 56° C erwärmt wurden. Von den negativen Seren stammten 7 von Tieren, die gegen Pferdeenzephalitis immunisiert worden waren. Während die 17 Immunseren ausnahmslos stark positiv reagierten, hemmten die negativen Seren die Hämolyse nicht.

Der negative Ausfall der Probe bei Immunseren gegen Pferdeenzephalitis spricht für die Spezifität der Reaktion und bestätigt die Angaben von Howitt (1938), die nach einer anderen Methode arbeitete. Um die Spezifität der Probe weiter zu prüfen, stellten wir außerdem Versuche mit je 1 Leber- und Lungenextrakt von gesunden Meerschweinchen sowie mit 4 normalen Mäuseembryonalextrakten an, die durchweg negative Ergebnisse lieferten. Ferner reagierten positive Meerschweinchenseren etwa gleich stark mit Antigenen von Mäusen und Meerschweinchen, nicht dagegen mit den entsprechenden Normalextrakten. Dasselbe trifft für positive Mäuseseren zu (s. Tabellen VI und VIII).

Komplementbindungsversuche mit Mäuseseren.

Drei verschiedene Arten von Mäuseseren wurden untersucht, nämlich virusfreie Immunseren von Mäusen, die einmal oder wiederholt mit Mäusepassagevirus geimpft worden waren, virushaltige Immunseren von Mäusen aus der infizierten Zuchtkolonie und Normalseren.

Die Spendertiere der virusfreien Immunseren stammten aus der virusfreien Zucht.

Die Seren 1—6 (Einzelseren) wurden von Mäusen gewonnen, die wie folgt vorbehandelt wurden: bornavirushaltige Gehirnaufschwemmung von Kaninchen iz. am 10. 9. 38; MB 52, 0,5 ccm ip. am 2. 11. 38; MB 53, 0,05 ccm iz. und 0,4 ccm ip. am 9. 11. 38; MB 52, 0,5 ccm ip. am 23. 11. 38. Entblutet am 6. 12. 38.

Serum 7: Sammelserum von 5 Mäusen. Immunisierung: MB 53, 1 ccm ip. am 3. 12. 38; MB 53, 0,05 ccm iz. und 0,3 ccm ip. am 12. 12. 38. Entblutet am 28. 12. 38.

Serum 8: Sammelserum von 3 Mäusen, die am 28. 12. 38 mit 1 ccm MB 53 ip. geimpft wurden. Blutentnahme am 5. 1. 39.

Serum 9: Sammelserum von 7 schwarzen Mäusen, die Produkte einer Kreuzung (F_1-Generation) zwischen den weißen Mäusen der virusfreien Kolonie und schwarzen Tieren nicht sicher bekannter Herkunft darstellten. Diese Tiere wurden in den Versuch genommen, um den Einfluß der Rasse auf das Bildungsvermögen von Antikörpern zu prüfen. Immunisierung: MB 54, 0,3 ccm im. am 24. 12. 38; MB 55, 0,05 ccm iz. und 1 ccm ip. am 31. 12. 38. Entblutet am 22. 1. 39.

Die Herkunft der Seren XII und XIII, die gleichzeitig zu Neutralisationsversuchen verwendet wurden, ist bereits oben beschrieben worden.

Die virushaltigen Immunseren stammten mit einer Ausnahme von natürlich immunisierten, nicht nachbehandelten Tieren. Zu bemerken ist dabei, daß die Mäuse der infizierten Kolonie vom Tage der Geburt an bis ans Lebensende eine hochgradige Immunität besitzen.

Serum 10 stammte von 12 Jungmäusen im Alter von 3—4 Wochen. Blutentnahme am 6. 12. 38.

Die Seren 11—28 waren Einzelseren von ausgewachsenen Zuchtmäusen. Tage der Blutentnahme: Serum 11 — 15. 12. 38; Seren 12—16 — 20. 12. 38; Seren 17—21 — 23. 12. 38; Serum 22 — 4. 1. 39; Seren 23—27 — 6. 1. 39; Serum 28 — 17. 1. 39.

Serum 29 war ein Sammelserum von 5 erwachsenen Zuchtmäusen, entblutet am 22. 1. 39.

Serum 30 gehört zwar nicht in diese Gruppe, da es von künstlich infizierten Mäusen stammte. Es wird aber dennoch hier aufgeführt, weil es bei intrazerebraler Verimpfung auf Mäuse virulent war. Es handelt sich um ein am 20. 12. 38 gewonnenes Sammelserum von 9 Mäusen aus der virusfreien Kolonie, die am 25. 11. 38 mit Lymphknotengewebe von einer infizierten Maus mit lymphatischer Leukämie nach verschiedenen Methoden geimpft wurden. Die Tiere waren sehr krank vom 6.—8. Tage p. i. und erholten sich dann langsam.

Die als Kontrollen dienenden 16 Normalseren A—Q stammten von unvorbehandelten Tieren aus der virusfreien Zucht mit Ausnahme der Einzelseren A—C, deren Spendertiere mit Pferde- bzw. Rindermaterial und normalem Mäusegewebe vorbehandelt waren. Normalserum P stammte von schwarzen Mäusen der obenerwähnten Kreuzung (F_1-Generation).

Sämtliche zu Komplementbindungsversuchen verwandten Mäuseseren wurden vor Gebrauch in der üblichen Weise inaktiviert. Die zu untersuchenden Seren wurden jeweils zusammen mit einem oder mehreren bekannt positiven und negativen Mäuseseren geprüft. Nach den in den folgenden Tabellen angegebenen Versuchsdaten ist es moglich, die gleichzeitig geprüften Seren zu identifizieren. Mit manchen Seren wurden mehrere Versuche, zum Teil mit verschiedenen Antigenen, angestellt.

Tabelle VI.
Komplementbindungsversuche mit virusfreien Immunseren von Mäusen.

Serum Nr.	Versuchs-datum	Antigen	Komplement		Antigenmenge in ccm						Serum-kontrolle
			MLD[5]) ccm	GD[4]) ccm	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,05	
1	17. 12. 38	E[1])	0,10	0,15	.	.	.	.	++	.	—
2	15. 12. 38	Le[2])	0,10	0,11	.	++	.	.	++	.	±
	19. 12. 38	E	0,10	0,13	.	.	.	.	++	.	—
3	15. 12. 38	Lu[3])	0,10	0,11	.	.	.	++	. .	.	—
	17. 12. 38	E	0,15	0,20	.	.	.	.	++	.	—
4	15. 12. 38	Lu	0,10	0,11	.	++	.	.	+	.	—
	19. 12. 38	E	0,10	0,13	.	.	.	.	++	.	—
	21. 12. 38	E	0,15	0,15	.	.	.	.	++—+++	.	—
5	19. 12. 38	E	0,10	0,13	.	.	.	.	++	.	—
6	17. 12. 38	E	0,10	0,15	.	.	.	.	++	.	—
7	29. 12. 38	E	0,125	0,16	.	.	.	.	++	.	—
	30. 12. 38	Le	0,15	0,17	.	.	.	.	+—++	.	—
	5. 1. 39	E	0,20	0,25	.	.	++—+++	.	++	+	—
	6. 1. 39	E	0,15	0,20	.	.	++—+++	++	+	.	—
	7. 1. 39	E	0,20	0,22	.	.	++—+++	.	.	.	—
8	5. 1. 39	E	0,20	0,25	.	.	++—+++	.	+—++	—	—
9	25. 1. 39	E	0,125	0,20	+++	.	++—+++	.	±	.	—
	17. 3. 39	E	0,10	0,15	+++	.	+++	.	±	.	—
XII	19. 1. 39	E	0,10	0,15	+++	.	+++	.	++—+++	.	—
	20. 1. 39	E	0,10	0,15	.	.	+++	.	.	.	—
	25. 1. 39	E	0,125	0,20	+++	.	++—+++	.	+	.	—
XIII	19. 1. 39	E	0,10	0,15	+++	.	+++	.	++	.	—
	25. 1. 39	E	0,125	0,20	++—+++	.	++	.	±	.	—

1) E = Mäuseembryonalantigen; 2) Le = Meerschweinchen-Leberantigen; 3) Lu = Meerschweinchen-Lungenantigen; 4) GD. = gebrauchte Komplementmenge; 5) MLD. = Minimale lösende Komplementmenge.

Wie aus Tabelle VI zu ersehen ist, enthielten virusfreie Immunseren regelmäßig komplementbindende Antikörper, wenn auch durchschnittlich in etwas geringeren Mengen als Immunseren von Meerschweinchen. Manche Seren, insbesondere Nr. 9, XII und XIII, hemmten jedoch die Hämolyse sehr stark. Bei dem am 15. 12. 38 ausgeführten Versuch mit Serum 2 war die gewählte Komplementmenge anscheinend etwas zu klein, um die Eigenhemmung des Serums zu überwinden. Der Unterschied im Grad der Hämolyse zwischen den antigenhaltigen Gemischen und der Serumkontrolle war jedoch stark genug, um Zweifel am positiven Ausfall der Reaktion zu beseitigen. Die Seren, die mit Mäuse- und Meerschweinchenantigen geprüft wurden, reagierten mit beiden Antigenarten etwa gleich stark positiv. Ueberraschenderweise wurden komplementbindende Antikörper bereits am 8. Tage nach intraperitonealer Impfung mit Mäusepassagevirus nachgewiesen (s. Seren 8 und XIII).

Tabelle VII.
Komplementbindungsversuche mit virushaltigen Immunseren von Mäusen.

Serum Nr.	Versuchsdatum	Komplement		Antigenmenge*)			Serumkontrolle
		MLD ccm	GD ccm	0,5 ccm	0,3 ccm	0,1 ccm	
10	19. 12. 38	0,10	0,13	.	.	—	—
11	19. 12. 38	0,10	0,13	.	.	—	—
	19. 1. 39	0,10	0,15	.	—	.	—
12	21. 12. 38	0,15	0,15	.	.	—	—
13	21. 12. 38	0,15	0,15	.	.	—	—
14	21. 12. 38	0,15	0.17	.	.	—	—
15	21. 12. 38	0,15	0,17	.	.	±	±
16	21. 12. 38	0,15	0,17	.	.	—	—
17	29. 12. 38	0,125	0,16	.	.	—	—
	5. 1. 39	0,20	0,25	.	—	.	—
18	29. 12. 38	0,125	0,16	.	.	±	—
19	29. 12. 38	0,125	0,16	.	.	±	—
20	29. 12. 38	0,125	0,16	.	.	—	—
21	29. 12. 38	0,125	0,16	.	.	—	—
22	5. 1. 39	0,20	0,25	.	—	.	—
23	7. 1. 39	0,20	0,22	.	+	±	±
24	7. 1. 39	0,20	0,22	.	—	—	—
	20. 1. 39	0,10	0,15	+	—	.	—
25	7. 1. 39	0,20	0,22	.	—	—	—
	20. 1. 39	0,10	0,15	+	—	.	—
26	7. 1. 39	0,20	0,22	.	+	±	—
	20. 1. 39	0,10	0,15	+—++	+	.	—
27	7. 1. 39	0,20	0,22	.	+	±	—
28	19. 1. 39	0,10	0,15	+	±	—	—
29	25. 1. 39	0,125	0,20	—	—	—	—
30	20. 1. 39	0,10	0,15	+++	++	+	—

*) E = Antigen wurde ausschließlich verwendet.

In virushaltigen Immunseren von natürlich infizierten Mäusen dagegen (Tabelle VII) wurden zum Teil überhaupt keine komplementbindenden Antikörper festgestellt, zum Teil enthielten sie nur geringe Mengen davon. Bei einer Reihe von Seren war das Ergebnis zweifelhaft. Jedenfalls stand das Hemmungsvermögen dieser Seren dem der virusfreien im Durchschnitt beträchtlich nach. Eine starke Hemmung der Hämolyse wurde jedoch bei Serum 30 verzeichnet, die wohl damit zu erklären ist, daß ein Teil der Spendertiere die experimentelle Infektion bereits überwunden hatte, als das Serum entnommen wurde.

Die mit den negativen Kontrollseren erzielten Ergebnisse sind in Tabelle VIII zusammengestellt. Zuweilen war bei starker Antigenkonzentration (0,5 bzw. 0,3 ccm) eine geringgradige, durch den Antigenüberschuß bedingte Hemmung der Hämolyse festzustellen, die jedoch in Röhrchen mit kleineren Antigenmengen fehlte.

Präzipitationsversuche.

Zwei Sammelseren von Mäusen, die mit dem Mäusepassagestamm hyperimmunisiert worden waren (darunter IS. XII), wurden auf präzipitierende Antikörper untersucht. Als Antigene dienten hochvirulente Embryonalextrakte, die in der Komplementbindungsprobe stark positive Ergebnisse geliefert hatten. Dennoch wurden in keinem Serum Präzipitine nachgewiesen. Wahrscheinlich war die in den Extrakten enthaltene Virusmenge zu gering, um ein erkennbares Präzipitat auszulösen (Merrill 1936).

Tabelle VIII.
Die mit normalen Mäuseseren erzielten Ergebnisse.

Serum Nr.	Versuchs-datum	Antigen	Komplement		Antigenmenge in ccm						Serum-Kontrolle
			MLD ccm	GD ccm	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,05	
A	15. 12. 38	Le	0,10	0,11	.	—	.	.	—	.	—
B	15. 12. 38	Lu	0,10	0,11	.	—	.	.	—	.	—
	19. 12. 38	E	0,10	0,13	.	.	.	.	—	.	—
C	15. 12. 38	Lu	0,10	0,11	.	.	.	—	.	.	—
	19. 12. 38	E	0,10	0,13	.	.	.	.	—	.	—
D	15. 12. 38	Lu	0,10	0,11	.	.	.	—	.	.	—
	17. 12. 38	E	0,15	0,20	.	.	.	.	—	.	—
	17. 12. 38	E	0,10	0,15	.	.	.	.	—	.	—
	19. 12. 38	E	0,10	0,13	.	.	.	.	—	.	—
	21. 12. 38	E	0,15	0,15	.	.	.	.	—	.	—
E	20. 1. 39	E	0,10	0,15	.	.	—	.	.	.	—
F	22. 12. 38	E	0,15	0,17	.	.	.	.	—	.	—
G	19. 1. 39	E	0,10	0,15	—	.	.	.	.	.	—
H	19. 1. 39	E	0,10	0,15	—	.	.	.	.	.	—
I	19. 1. 39	E	0,10	0,15	—	.	.	.	.	.	—
K	19. 1. 39	E	0,10	0,15	—	.	.	.	.	.	—
L	29. 12. 38	E	0,125	0,16	.	.	.	.	—	.	—
	30. 12. 38	E	0,15	0,17	.	.	.	.	—	.	—
	30. 12. 38	Le	0,15	0,17	.	.	.	.	—	.	—
	5. 1. 39	E	0,20	0,25	.	.	—	.	.	—	—
M	30. 12. 38	E	0,15	0,17	.	.	.	.	—	.	—
	5. 1. 39	E	0,20	0,25	.	.	—	.	—	—	—
	6. 1. 39	E	0,15	0,20	.	.	±	—	—	.	—
	7. 1. 39	E	0,20	0,22	.	.	—	.	.	.	—
N	6. 1. 39	E	0,15	0,20	.	.	±	—	—	.	—
	19. 1. 39	E	0,10	0,15	—	.	—	.	—	.	—
	20. 1. 39	E	0,10	0,15	+	.	—	.	.	.	—
	25. 1. 39	E	0,125	0,20	—	.	—	.	—	.	—
O	25. 1. 39	E	0,125	0,20	—	.	—	.	—	.	—
P	17. 3. 39	E	0,10	0,15	+	.	—	.	—	.	—
Q	17. 3. 39	E	0,10	0,15	+	.	—	.	—	.	—

Besprechung der Versuchsergebnisse.

Die Ergebnisse der Neutralisationsversuche vermögen die eingangs gestellte Frage, ob Mäuse überhaupt imstande sind, spezifische Schutzstoffe gegen das Choriomeningitisvirus zu bilden, nicht eindeutig zu beantworten. Eine Reihe von Seren immuner Mäuse besaß bei der gewählten Versuchsanordnung keinerlei Neutralisationsvermögen. Bei anderen dagegen gewann man den Eindruck, als ob sie eine geringgradige Schutzwirkung entfalteten, die meistens nur im Mäuseversuch, einmal aber auch nur im Meerschweinchenversuch hervortrat. In keinem Fall war jedoch die Schutzwirkung so stark, daß man auf das Vorhandensein neutralisierender Antistoffe im Serum mit Sicherheit schließen konnte. Zwei Immunseren (IS. XI, Tabelle V und IS. XII, Tabelle IV) schienen die Empfänglichkeit der damit geimpften Tiere sogar zu steigern. Beim letztgenannten Serum war die empfänglichkeitssteigernde Wirkung allerdings nur in einem der beiden Meerschweinchenversuche zu erkennen, nicht dagegen im Mäuseversuch (Tabelle III). Sie ist vielleicht mit dem früher beschriebenen (Traub 1938a) allergischen Zustand der Mäuse in einem gewissen Stadium der Immunität in Zusammenhang zu bringen, doch möchten wir nicht näher darauf eingehen, solange wir keine Methode kennen, sie konstant zu reproduzieren und noch deutlicher zu gestalten.

Die geprüften Gehirn- und Leberextrakte von immunen Mäusen ließen eine deutliche Schutzkraft vermissen, so daß hier keine sicheren Anhaltspunkte dafür vorliegen, daß die Immunkörper in den Geweben verankert sind (Bedson 1937).

Vielmehr bekräftigen die Versuchsergebnisse die Vermutung, daß die Immunität der Mäuse gegen Choriomeningitis nicht auf humoralen Schutzstoffen beruht. Eine starke Stütze findet diese Auffassung in dem hohen Virusgehalt des Blutes und der Organe immuner Mäuse der infizierten Kolonie (Traub 1938). Es kann zwar als erwiesen gelten, daß aktives Virus und neutralisierende Antistoffe gleichzeitig im Serum vorkommen können, doch kann man im vorliegenden Fall an ihrer Rolle als alleinige Immunitätsfaktoren zweifeln, da sie höchstens in Spuren vorhanden gewesen sein konnten, die gegenüber den großen Virusmengen machtlos waren.

Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang noch die Tatsache, daß es selbst mit den im Neutralisationsversuch wirksamsten Immunseren von Meerschweinchen nur selten gelingt, bei Mäusen eine so starke passive Immunität zu erzeugen, daß sie der intrazerebralen Impfung mit sehr kleinen Virusdosen ganz widerstehen. Dennoch aber sind die Antikörper im Serum solcher Mäuse durch den Neutralisationsversuch leicht nachzuweisen (s. Tabelle II). Wären nun bei den aktiv immunen Mäusen mit einer viel größeren Resistenz die humoralen Schutzstoffe die alleinigen Immunitätsfaktoren, so sollte man diese noch viel leichter feststellen können als bei den passiv immunisierten Tieren. Dieser Analogieschluß wird sicher dem Einwand begegnen, daß die künstlich zugeführten Antistoffe die Blut-Gehirnschranke nicht überschreiten können. Dem ist aber die Erfahrungstatsache entgegenzuhalten, daß es durch intravenöse Impfung mit hochwertigen Immunseren von Meerschweinchen nicht leicht gelingt, Mäuse gegen die intrazerebrale Infektion mit sehr kleinen Dosen Pferdeenzephalitisvirus passiv zu immunisieren.

Komplementbindende Antikörper sind bei Choriomeningitis zuerst von Howitt (1937) in Immunseren von Meerschweinchen nachgewiesen worden. Lépine und Sautter (1938) haben sie auch in menschlichem Serum festgestellt. Nach Lépine, Mollaret und Sautter (1938) gelingt die Komplementbindung mit Immunseren von Menschen, Affen und Kaninchen leicht, dagegen hatten diese Autoren mit Meerschweinchenseren keinen Erfolg. Das Vorkommen erheblicher Mengen von komplementbindenden Antikörpern im Serum von immunen Mäusen überraschte uns zunächst, weil der Nachweis von neutralisierenden Antistoffen in diesen Seren nicht mit Sicherheit gelang. Wir vermuteten daher, daß die komplementbindenden Antikörper nicht gegen das Virus selbst, sondern gegen eine im Verlaufe der Infektion entstehende spezifische lösliche Substanz gerichtet sind, wie sie bei Vakzine und einer Reihe von anderen Viruskrankheiten nachgewiesen worden ist. Die inzwischen veröffentlichten Untersuchungen von Smadel, Baird und Wall (1939), nach denen eine solche Substanz auch bei Choriomeningitis vorkommt, bestätigten diese Vermutung. Es ist also wahrscheinlich, daß die in Mäuseseren nachgewiesenen komplementbindenden Antikörper keine Beziehungen zum Virus selbst haben. Ihr Vorhandensein vermag daher die eingangs aufgeworfene Frage nicht zu beantworten.

Das völlige oder fast völlige Fehlen von komplementbindenden Antikörpern in virushaltigen Seren von Mäusen aus der infizierten Zucht ist schwer zu erklären, zumal da die Seren von Mäusen, die mit dem Mäusepassagestamm geimpft wurden, bereits am 8. Tage p. i. die Hämolyse stark hemmen. Um diese Zeit befindet sich sicher noch aktives Virus irgendwo im Körper, wenn wir es auch im Blute nicht mehr nachweisen konnten.

Zusammenfassung.

Die Immunisierung von Mäusen gegen die lymphozytische Choriomeningitis mit Mäusepassagevirus, das anscheinend eine sterile Immunität erzeugt, führt zur Bildung von komplementbindenden Antikörpern, die im Serum bereits am 8. Tage p. i. leicht nachgewiesen werden können. Dagegen wurden neutralisierende Antikörper in den Seren von ein- oder mehrmalig vorbehandelten Mäusen nicht mit Sicherheit ermittelt. Dasselbe trifft für Extrakte aus Gehirn und Leber dieser Tiere zu. Die Untersuchung zweier Immunseren auf präzipitierende Antikörper verlief ebenfalls negativ.

Die komplementbindenden Antikörper sind wahrscheinlich nicht gegen das Virus selbst gerichtet, sondern gegen eine im Verlaufe der Infektion entstehende spezifische lösliche Substanz, die kürzlich von anderer Seite nachgewiesen worden ist.

In virushaltigen Seren von immunen Mäusen aus der infizierten Zucht wurden komplementbindende Antikörper entweder gar nicht oder nur in verhältnismäßig geringen Mengen festgestellt.

Schrifttum.

Bedson, S. P., Proc. roy. Soc. Med. **31**, 59 (1937). — Francis, Th. Jr., u. Stuart-Harris, C. H., J. of exper. Med. **68**, 813 (1938). — Hodes, H. L., u. Webster, L. T., ebenda **68**, 263 (1938). — Howitt B. F. Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **35** 526 (1937). — Lépine P., u. Sautter, V., Ann. Inst. Pasteur **61**, 519 (1938). — Lépine, P., Mollaret, P., u. Sautter, V., C. r. Soc. Biol. **124**, 925 (1938). — Merrill, M. H., J. of Immun. **30**, 169 (1936). — Smadel, J. E., Baird, R. D., u. Wall, M. J., Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **40**, 71 (1939). — Stuart-Harris, C. H., u. Francis, Th. Jr., J. of exper. Med. **68**, 803 (1938). — Traub, E., J. of exper. Med. **63**, 847 (1936a); **64**, 183 (1936b); **66**, 317 (1937); **68**, 229 (1938); ebenda, im Druck (1939): Z. Inf.krkh. Haustiere **54**, 169 (1939b).— Wagner, W., Vet.-Med. Diss. Gießen, 1937. — Webster, L.T., J. of exper. Med. **68**, 111 (1938). — Witte, J., Berl. tierärztl. Wschr. **1933**, 180.

[Aus dem Institut Robert Koch, Berlin.]

Versuche mit einem in Deutschland isolierten Influenzavirusstamm.

Von Prof. Dr. **E. Haagen** und Dr. **Du Dscheng-Hsing**.

Untersuchungen über die Aetiologie der menschlichen epidemischen Influenza, die seit etwa 8 Jahren besonders in Amerika und England von verschiedenen Forschern angestellt worden sind, haben die schon lange gehegte Vermutung bestätigt, daß bei der Entstehung dieser Krankheit ein Virus maßgeblich beteiligt ist. Im Jahre 1933 gelang Smith, Andrewes und Laidlaw erstmalig die Isolierung eines menschlichen Influenzavirus, nachdem bereits Shope (1931) festgestellt hatte, daß auch die Schweineinfluenza eine

Viruskrankheit ist. Seitdem sind in verschiedenen Laboratorien bei menschlichen Influenzaerkrankungen Virusstämme gewonnen und gezüchtet worden. Durch Tierversuche konnte weiterhin eindeutig bewiesen werden, daß das menschliche Influenzavirus selbständig pathogene Eigenschaften besitzt, die immer wieder zu demselben typischen Krankheitsbild führen, ohne daß andere Erreger, insbesondere der Pfeiffersche Influenzabazillus unmittelbar bei der Entstehung der Krankheitsprozesse eine ursächliche Rolle spielen. Auf die wesentlichen Ergebnisse der Influenzavirusforschung ist kürzlich von K. Herzberg (1938) zusammenfassend in dieser Zeitschrift eingegangen worden.

Unseres Wissens ist in Deutschland noch kein Influenzavirusstamm isoliert worden, so daß hier bisher auch keine Erfahrungen mit einem eigenen Virus gesammelt werden konnten.

Als unsere Versuche in dieser Richtung vor etwa einem Jahre aufgenommen wurden, fielen diese insofern allerdings in eine ungünstige Zeit, als sie gerade frei von epidemiehaftem Auftreten der Influenza war. Die Versuche, einen Virusstamm zu isolieren, mußten sich daher auf die Durchuntersuchung sporadischer Erkrankungsfälle beschränken. Die Aussichten, unter diesen Voraussetzungen einen Virusstamm zu bekommen, mußten also zunächst als ziemlich schlecht bezeichnet werden, wie dies auch aus den bisherigen Erfahrungen anderer Autoren hervorgeht.

In dieser epidemiefreien Zeit wurden über 30 sporadische Fälle, deren Krankheitsbild Influenzaverdacht erregte, untersucht. Als Ausgangsmaterial dienten Gurgelwasser oder sekrethaltige Nasenrachenspülungen. Als Gurgel- bzw. Spülflüssigkeit wurde physiologische Kochsalzlösung verwandt.

Für die Uebertragungsversuche wurden ausschließlich Mäuse benutzt, nachdem Smith und Stuart sowie Francis und Magill (1937) die an sich bestehende Empfänglichkeit dieser Tiere für das menschliche Influenzavirus auch ohne vorausgehende Frettchenpassagen festgestellt hatten. Francis und Magill machten hierbei die Erfahrung, daß erst mehrere Mäusepassagen stattfinden mußten, bevor das Virus in den Lungen Krankheitserscheinungen auszulösen vermochte. Stuart-Harris, Andrewes und Smith (1938) gelang allerdings eine derartige unmittelbare Uebertragung des Virus von Mensch auf Maus nicht.

Unter den etwa 30 untersuchten Fällen gelang nur einmal die Isolierung eines Influenzavirusstammes durch Uebertragung von Gurgelwasser oder Nasenrachenspülung auf die Maus. Ob bei den übrigen Erkrankten überhaupt kein Virus vorhanden war, oder solches zwar nicht im Mäuseversuch, wohl aber im Frettchenversuch nachweisbar geworden wäre, läßt sich nicht entscheiden. Das virushaltige Material stammte von einem Kollegen, der zur Zeit der Untersuchungen im April 1938 eine katarrhalische Erkrankung der oberen Luftwege mit Fieber und starker Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens durchmachte, die zum mindesten den Verdacht einer epidemischen Influenza erweckte.

Gewinnung des Virus. Die durch eine Nasenrachenspülung gewonnene sekrethaltige Flüssigkeit wurde mit der gleichen Menge Nährbouillon gemischt und nach tüchtigem Schütteln teils so verwandt, teils zuvor durch Berkefeld-V-Kerzen filtriert. Um etwa im Sekretmaterial enthaltenes Virus leichter zum Haften zu bringen, wurden die Mäuse mit Aether narkotisiert und ihnen im Aetherschlaf das Sekretmaterial in die Nasenlöcher geträufelt. Jede Maus erhielt etwa 0,05 ccm instilliert, und zwar bekamen 4 Mäuse unfiltriertes sowie 4 Mäuse filtriertes Sekretmaterial.

Von den intranasal mit unfiltriertem Material geimpften Tieren starben 2 nach 5 und 6 Tagen. Die beiden übrigen Mäuse wurden gleichzeitig getötet.

Der Lungenbefund wies auf eine bakterielle Infektion (Abszeßbildung, petechiale Blutungen im Lungengewebe) hin.

Von den mit Filtrat geimpften Mäusen machten am 6. Tage nach der Instillation 2 Mäuse einen deutlich kranken, die 3. Maus einen nur leichtkranken Eindruck, während die 4. Maus gesund erschien. Alle Mäuse wurden getötet und von ihnen der Lungenbefund erhoben. Die beiden schwer krank gewesenen Tiere wiesen Entzündungsprozesse teils am Hilus, teils in den Lungenspitzen auf: bei den übrigen Tieren ergab sich kein nennenswerter Lungenbefund. Die Feststellung charakteristischer Lungenveränderungen bei den ersten beiden Mäusen spricht also gegen die Ansicht, daß das Influenzavirus bei den Tieren der ersten Passagen, d. h. so lange es noch nicht adaptiert ist, keine Lungenprozesse hervorruft. Ob diese Eigenschaft eines Influenzavirusstammes, schon nach der erstmaligen Verimpfung vom Menschen in den Mäuselungen Veränderungen hervorzurufen, nur vereinzelt vorkommt, bedarf noch weiterer Untersuchungen.

Zur passageweisen Weiterimpfung des Virus von Maus zu Maus wurden die Lungen der erkrankten oder eben verstorbenen Tiere steril entnommen, mit Kochsalzlösung fein zerrieben und zentrifugiert oder auch zum Absetzen nur stehen gelassen. Die Lungensuspension war etwa 10proz. Diese wurde teils unfiltriert, teils filtriert je 4 Mäusen wieder intranasal instilliert. Hier seien nur die Filtratversuche besprochen.

In der ersten Passage erkrankten am 6. Tage 3 Mäuse unter leichten Erscheinungen seitens der Lungen. Die Tiere der 3. Passage aber wiesen am 6. Tage alle bereits schwere Lungenveränderungen auf. Diese konnten schon als Zeichen einer zunehmenden Adaptierung des Influenzavirus angesehen werden.

Das klinische Bild der kranken Mäuse nach der Adaptierung des Virus entsprach etwa dem, wie es von den englischen und amerikanischen Autoren beschrieben worden ist. Schon 2 Tage nach der Infektion begannen die Tiere still zu werden; sie hockten im Glase zusammen, zeigten Freßunlust und struppiges Fell. Im Verlaufe der nächsten Tage wurde der Allgemeinzustand zunehmend schlechter: die Atmung wurde angestrengt, die Temperatur war erhöht und fiel erst vor dem Exitus stark ab. Je nach der verwandten Virusmenge und der individuellen Empfänglichkeit starben die Tiere zwischen 3 und 14 Tagen. Genesung kam vor. Als einziges pathologisch-anatomisches Merkmal findet man bei den mit Influenzavirus infizierten Mäusen die Lungenveränderungen. Eine Affinität zu anderen Organen oder Geweben konnte noch nicht festgestellt werden. Dies entspricht voll und ganz der Auffassung Waldmanns von der Pneumotropie des Influenzavirus.

Bei der makroskopischen Betrachtung erschienen die Lungen kirschrot, luftleer, von kleinen emphysematösen Stellen an der Oberfläche abgesehen. Vielfach sahen die ganzen Lungen hepatisiert aus, häufiger war aber nur eine Hälfte, besonders der obere Lappen betroffen. Die histologische Untersuchung ergab mehr oder weniger ausgedehnte entzündliche infiltrative Prozesse mit Fibrin und Blutzellen enthaltenden Alveolen. Die großen Bronchien der kranken Lungenlappen enthielten abgeschilferte Epithelzellen und Leukozyten.

Um nun die Frage zu prüfen, ob die hier beobachteten Lungenprozesse spezifischer Natur, d. h. durch das im Filtrat des menschlichen Sekretmaterials enthaltene Virus bedingt waren, wurden entsprechende Kontrollversuche angestellt. U. a. wurde je 5 Mäusen mit und ohne Narkose eine Lungensuspension normaler Mäuse in die Nasenlöcher geträufelt. Nach einer Beobachtungszeit von 8 Tagen wurden diese Mäuse getötet und ihre Lungen untersucht. Keines dieser Tiere zeigte makroskopisch oder mikroskopisch irgendwelche Lungen-

veränderungen. Lungengewebe allein sowie die Narkose konnten als Entzündungsursachen ausgeschlossen werden.

Wiederholt vorgenommene bakteriologische Kontrollen kranker Mäuselungen, insbesondere Isolierungsversuche von Influenzabazillen auf Levinthalschem Kochblutagar, verliefen regelmäßig negativ. Bakterielle Erreger dürften daher keine ursächliche Rolle gespielt haben, denn die Kontrolltiere haben sicherlich dieselbe Bakterienflora gehabt wie die Versuchstiere. Aber trotz zusätzlicher Reizung in Form von Narkose und Lungensuspensionseinträufelung haben diese Tiere in Abwesenheit des Virus keine Lungenprozesse entwickelt.

Solche entstanden aber experimentell mit virushaltigem Filtrat allein. Obwohl kein Zweifel mehr bestehen konnte, daß es sich bei dem im Filtrat enthaltenen Virus um Influenzavirus handelte, wurden zur Sicherstellung dieser Auffassung noch weitere vergleichende Untersuchungen mit einem bereits bekannten Influenzavirusstamm angestellt. Zu diesem Zwecke wurde ein Stamm, der uns freundlicherweise von Herrn Dr. Tailor, Budapest, überlassen worden war, verwandt.

Zunächst sei noch kurz auf einige Filtrationsversuche mit dem von uns isolierten Virus eingegangen. Infizierte Mäuselungen wurden im Verhältnis von 1 : 50 mit Ringerlösung oder Serum-Ringer (10proz.) fein zerrieben und durch Berkefeld-Filter V, N und W sowie durch Seitz-EK-Filter filtriert. Von 4 Mäusen, die mit dem Berkefeld-V-Filtrat infiziert worden waren, erkrankten und starben alle 4 innerhalb von 4—6 Tagen. Gleiches war mit dem Berkefeld-N-Filtrat der Fall. Von den mit W-Filtrat infizierten 5 Mäusen erkrankten und starben ebenfalls alle 5 Tiere, aber erst nach 7—15 Tagen. Das Berkefeld-W-Filter hielt also offenbar so viel Virus zurück, daß nur geringe Mengen zur intranasalen Instillation kamen, wodurch sich eine längere Entwicklungsdauer des Virus und damit auch eine längere Krankheitszeit bei den Mäusen ergab.

Bemerkenswert ist, daß die EK-Filter von Seitz anscheinend das Virus zurückhalten. Worauf dies beruht, konnte noch nicht geklärt werden. Es mag hier die Art der elektrischen Ladung der Teilchen eine Rolle spielen. Auch Herzberg gelang eine Filtration durch Seitz-EK-Filter nicht.

Besondere Unterschiede der Filtrierbarkeit bei Verwendung von Ringerlösung oder 10 Proz. Serum enthaltender Ringerlösung als Verdünnungsflüssigkeit ergaben sich nicht.

Francis und Magill hatten beobachtet, daß das Influenzavirus subkutan oder intraperitoneal eingespritzt bei Mäusen keine manifesten Krankheitserscheinungen zu erzeugen vermag. Die so behandelten Tiere erwarben aber eine Immunität gegen eine später vorgenommene intranasale Reinfektion. Entsprechende Erfahrungen wurden von uns gemacht. 6 Mäuse erhielten in einem Intervall von 10 Tagen zweimal eine intraperitoneale Injektion von 0,5 ccm oder eine subkutane Infektion von 0,1 ccm einer 1proz. durch Berkefeld-V-Kerzen filtrierten Lungensuspension mit Virusstamm Tailor infiziert gewesener Tiere. Die Mäuse blieben vollständig gesund. 10 Tage nach der zweiten intraperitonealen bzw. subkutanen Impfung wurde den Mäusen derselbe Virusstamm in die Nasenlöcher geträufelt. Nach einer weiteren Beobachtungszeit von 7 Tagen wurden diese Mäuse getötet und auf Lungenveränderungen untersucht. Solche fehlten vollständig. Die zur Kontrolle ebenfalls intranasal mit Virus infizierten, aber unvorbehandelt gebliebenen, also normalen Mäuse, erkrankten sämtlich nach 5 Tagen mit charakteristischem Lungenbefund.

Ein übereinstimmendes Ergebnis wurde mit unserem Virusstamm erzielt, d. h. auch dieser schützte nach zweimaliger intraperitonealer bzw. subkutaner Impfung gegen eine nachfolgende intranasale Infektion. Ebenso wie Francis

und Magill stellten auch wir fest, daß eine einmalige Impfung jedoch noch nicht genügte, um eine hinreichende Immunität gegen eine intranasale Infektion zu erzeugen. Mitunter war sogar nach der zweiten Injektion noch keine genügende Immunität entstanden, um gegen eine nasale Nachinfektion zu schützen.

Um insbesondere die Identität unseres Virus mit dem Virusstamm Tailor zu prüfen, wurden kreuzweise Immunisierungsversuche angestellt. Zu diesem Zwecke wurde eine Gruppe von 12 Mäusen durch zweimalige intraperitoneale Injektion eines Filtrates von Stamm Tailor und eine weitere Gruppe in gleicher Weise mit unserem Stamm immunisiert. 10 Tage nach der letzten Injektion erhielten die mit Stamm Tailor vorbehandelten Tiere teils Filtrat unseres Stammes und teils solches des Stammes Tailor, sowie umgekehrt die mit unserem Stamme immunisierten Mäuse wieder teils Filtrat des Stammes Tailor und teils Filtrat unseres Stammes intranasal instilliert. In allen Fällen ergab sich ein kompletter Schutz gegen beide Stämme. Dieser gelungene kreuzweise Immunisierungsversuch zeigt die Antigengleichheit beider Virusstämme an.

Das Serum der immunisierten Mäuse wurde anschließend im Neutralisierungsversuch gegen beide Virusstämme geprüft. Das Serum wurde in verschiedenen Verdünnungen mit einer Virussuspension von 1:100 zu gleichen Teilen gemischt. Um eine hinreichende Bindung des Virus mit den neutralisierenden Antikörpern zu erreichen, wurden die Gemische zunächst zwei Stunden bei 37° C gehalten. Die Sera zeigten noch ein Neutralisationsvermögen in einer Verdünnung von 1:800; und zwar neutralisierten sie sowohl das homologe Virus Tailor als auch unser heterologes Virus. Es ergab sich also ein komplettes Neutralisationsvermögen für beide Influenzavirusstämme.

Unser Virusstamm wurde schließlich noch auf seine Frettchenpathogenität untersucht, und dabei wieder mit dem Stamm Tailor verglichen. Beide Virusstämme wurden intranasal auf Frettchen verimpft. Die Tiere erkrankten leicht und genasen nach einer Woche. Um eine möglichst kräftige Immunisierung zu erzielen, erhielten diese Tiere außerdem die entsprechenden Virusstämme zweimal in einem Abstand von einer Woche subkutan injiziert. 10 Tage später erfolgte Herzpunktion zur Serumgewinnung. Das Neutralisationsvermögen der so gewonnenen Immunsera wurde im Mäuseversuch in der üblichen Weise gegen das homologe Virus und den fremden Stamm geprüft.

Es zeigte sich, daß das Frettchenantiserum Tailor nicht nur das Virus Tailor, sondern auch unser Virus neutralisierte und umgekehrt. Die vorliegenden Untersuchungen ergaben also eine völlige Identität unseres Virusstammes mit dem bereits bekannten und schon seit einigen Jahren auf Tieren fortgezüchteten Influenzastamm Tailor bezüglich Pathogenität, Immunisierungs- und Neutralisationsvermögen.

Von Interesse erscheint der Ausfall eines Neutralisationsversuches, der mit dem Serum des Virusspenders etwa 1 Jahr nach der Isolierung des Influenzavirus angestellt wurde. Unverdünntes Serum neutralisierte filtriertes Virus in einer Verdünnung von 1:100 vollständig. Ob dieses Neutralisationsvermögen der Ausdruck einer schon länger bestehenden Immunität ist oder erst nach einer weiteren leichten und unbemerkt gebliebenen Erkrankung in letzter Zeit neu entstanden ist, kann nicht angegeben werden.

Unser Virusstamm wurde bisher durch 35 Mäusepassagen gezüchtet. Eine Abwandlung der pathogenen Eigenschaften des Virus während dieser Zeit wurde nicht beobachtet. Eine gewisse Zunahme seiner Mäusepathogenität schien aber stattgefunden zu haben. Das Virus kann als pneumotropes Virus

fixe für Mäuse bezeichnet werden. Berkefeld-V-Filtrate der 32. Tierpassage führten noch in Verdünnungen von 1:10000 zu typischen Lungenprozessen.

Eine Züchtung des Virus auf der Chorioallantois des befruchteten und bebrüteten Hühnereies war ebenfalls ohne Schwierigkeiten möglich. Ueber diese Versuche wird besonders berichtet werden.

Zusammenfassung.

Von einem an einer leichten Influenza Erkrankten wurde ein Virusstamm isoliert, der unmittelbar auf Mäuse übertragbar war. Vergleichende Untersuchungen mit einem bereits bekannten Influenzavirus ergaben eine vollständige Identität beider Stämme.

Schrifttum.

Shope, R. E., J. of exper. Med. **54**, 373 (1931). — Smith, W., Andrewes, C. H., a. Laidlaw, P. P., Lancet 66 (1933). — Andrewes, C. H., Lailaw, P. P., a. Smith, W., Lancet 859 (1934). — Francis, Th., a. Magill, Th. P., Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **36**, 132 (1937). — Stuart-Harris, C. H., Andrewes, C. H., a. Smith, W., Med. Res. Counc., Spec. Rep. Ser., Nr 228 (1938). — Herzberg, K., Zbl. Bakter. I Orig. **143**, 93 (1938).

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität in Bonn (Direktor: Prof. Dr. med. H. Selter).]

Experimentelle Untersuchungen über die wachstumshemmende Kraft des Blutserums von immunisierten, tuberkulösen und normalen Meerschweinchen Tuberkelbazillen gegenüber.

Von A. Nagel und M. Fenkner.

Die Einwirkung von Körperflüssigkeiten tuberkulöser und gesunder Menschen und Tiere auf das Wachstum von Tuberkelbazillen ist schon Gegenstand zahlreicher Forschungen gewesen. Im Vordergrund des Interesses standen neben den Untersuchungen von Speichel, Pleura-Gelenkergüssen usw. vor allem die des Blutserums. Sinn und Zweck dieser Forschungen waren verschieden. Einmal wollte man die Frage nach der Beteiligung humoraler Kräfte des Organismus, besonders der des Blutserums, an der Entwicklung der Infektionsimmunität aufklären, zum andern versuchte man aus der Größe der Bakterizidie Schlüsse für Verlauf und Ausbreitungscharakter der tuberkulösen Erkrankungen zu ziehen (Pagel). Schließlich ist man, seitdem u. a. Hübschmann, Wurm, Henke, Koppenhöfer, Pagel, Pfaff und Herold festgestellt haben, daß die tuberkulösen Herde nicht gefäßlos sind, auf der Suche nach therapeutisch wirksamen Mitteln, die den Koch-Bazillus im tuberkulösen Gewebe erreichen und vernichten können.

Zahlreiche Autoren, u. a. Courmont, Paul, Gardère, Angelesio, Yabushita, Hedvall, Sonak und Pagel haben in zahlreichen Versuchen wachstumshemmende Stoffe besonders im tuberkulosen Organismus nachgewiesen.

Courmont, Paul und Gardère prüften die bakteriziden und agglutinierenden Kräfte des Blutserums verschiedener Tiere. Sie fanden, daß die Bakterizidie des Serums von gesunden Pferden, Rindern und Hunden sehr groß ist, während die der Seren von Menschen, Kaninchen und Meerschweinchen Tuberkelbazillen gegenüber bei weitem geringer ist. Courmont und Gardère stellten außerdem fest, daß tuberkulose Pleuraergüsse das Wachstum von Kochbazillen hemmen können, wenn diese in nicht zu großer Zahl vorhanden sind.

Angelesio untersuchte die bakteriziden Kräfte von traumatischen und tuberkulösen Gelenkergüssen; er stellte ebenfalls eine wachstumshemmende Eigenschaft der tuberkulosen Gelenkergüsse fest.

Yabushita fand, daß die Bakterizidie von avitaminotisch ernährten Ratten dem Tuberkelbazillus gegenüber bedeutend herabgesetzt ist.

Hedvall wies im Normalserum von Mensch, Pferd, Rind, Hund, Katze, Kaninchen und Meerschweinchen wachstumshemmende Stoffe nach. Diese bakterizide Kraft soll auf den von Buchner im Serum nachgewiesenen β-Lysinen beruhen. Nach seiner Feststellung unterscheiden sich Immunsera und normale Seren hierbei nicht.

Sonak stellte im Blut von pirquetpositiven Kindern wachstumshemmende Stoffe fest, während das Blut von pirquetnegativen und Masernkindern das Wachstum von Tuberkelbazillen begünstigen soll.

Pagel hat in mehreren Untersuchungen wachstumshemmende Eigenschaften der Seren Tuberkuloser nachgewiesen. Während seine früheren Experimente zeigten, daß die Bakterizidie des Blutserums mit der Ausbreitung der Erkrankung in der Lunge parallel ging, scheinen spätere Untersuchungen zu ergeben, daß nicht Grad und Ausbreitung der Erkrankung, sondern Entwicklungsform und Ausbreitungscharakter mit der bakteriziden Kraft des Serums in irgendeinem ursächlichen Zusammenhang stehen.

Die Untersuchungen dieser und auch anderer Autoren gaben uns die Anregung nochmals nachzuprüfen, ob sich im Blutserum immunisierter, tuberkulöser und normaler Meerschweinchen wachstumshemmende Stoffe nachweisen lassen, und wenn, ob man dann einen Zusammenhang dieser mit der Entwicklung der Infektionsimmunität oder dem Ablauf der tuberkulösen Erkrankung erkennen konnte.

Wir prüften die Seren von 16 tuberkulösen und 4 gesunden Meerschweinchen auf ihre bakterizide Kraft an 3 verschieden virulenten Tuberkelbazillenstämmen und einem virulenten Mischimpfstoff. Ein fünfter boviner Stamm fiel leider im Versuch aus, da er aus ungeklärten Gründen nicht zum Wachstum kam. Die Virulenz der 3 Wochen alten Tuberkelbazillenkulturen, die auf festen Küss-Nährböden gezüchtet waren, war uns aus Tierversuchen bekannt. Stamm 1 war stark virulent, Stamm 2 mittelstark und Stamm 3 war nur schwach virulent. Den Mischimpfstoff stellten wir aus Stamm 1 und Stamm 3 her.

Die tuberkulösen Tiere stammten aus verschiedenen Immunisierungsversuchen. 6 der 16 tuberkulösen Tiere gehörten zu einer Versuchsreihe, der wir zur Erzielung eines Immunitätseffektes einen Vaselinimpfstoff (50 mg abgetöteter virulenter Mischimpfstoff in 1 ccm Vaselinöl) am 27. 6. 38 zum Teil subkutan, zum Teil intraperitoneal eingeimpft hatten. Am 25. 8. 38 wurden diese Tiere bis auf Tier Nr. 41, das aus der Kontrollgruppe zum Vaselinimpfstoff genommen wurde, mit $^1/_{20000000}$ bzw. mit $^1/_{1000000}$ mg eines mäßig virulenten Mischimpfstoffes superinfiziert. 4 Tiere stammten aus einer Versuchsgruppe, die mit $^1/_{20000}$ mg des schwach virulenten Bazillenstammes E.M. immunisiert waren, und die am 25. 8. 38 mit dem erwähnten Mischimpfstoff superinfiziert worden waren. 4 Tiere waren der Kontrollgruppe für den Superinfektionsimpfstoff entnommen. 2 Tiere waren Kontrolle zum E.M.-Impfstoff. Die übrigen 4 Tiere waren gesund.

Der eine Teil der Tiere (9), deren Serum wir untersuchten, wurde 5 Monate, der andere Teil (11) 6 Monate nach der Erstinfektion getötet und das Blut steril aufgefangen. Danach wurde der makroskopische Befund und später nach

Formolfixierung bzw. nach Paraffineinbettung auch der histologische Befund an den Organen festgestellt. Die einzelnen Daten sind aus den folgenden Tabellen zu ersehen.

Während von den meisten Autoren die wachstumshemmenden Körperflüssigkeiten den Nährböden zugesetzt wurden, ließen wir das Serum sofort auf eine in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmte Bazillenemulsion einwirken.

Bevor wir nun das durch Absitzen oder nötigenfalls auch Zentrifugieren gewonnene Serum auf die Bazillenaufschwemmung einwirken ließen, untersuchten wir ihren Gehalt an serologisch nachweisbaren Antikörpern. Diese Prüfung wurde von der nach Witebsky, Kuhn, Klingenstein angegebenen Methode vorgenommen, die, wie Weiland feststellen konnte, sich für den Nachweis tuberkulöser Antikörper im Meerschweinchenserum am besten eignet. Der Nachweis komplementbindender Antikörper gelang bei 5 von den mit Vaselinimpfstoff behandelten Tieren, bei dem 6. Tier aus dieser Gruppe war der Befund zweifelhaft. Die Seren aller übrigen Tiere waren frei von Antikörpern.

Die Bazillenaufschwemmungen stellten wir nach der von Blumenberg angegebenen Oxalatmethode her. Eine von festen Küss-Nährböden stammende abgewogene Menge Tb-Bazillenkultur wurde im Achatmörser unter tropfenweisem Zusatz von 1 ccm Natriumoxalat gründlich verrieben und mit physiologischer Kochsalzlösung so aufgeschwemmt, daß wir für Gruppe 1 $^1/_{100}$ mg Tb-Bazillen, für Gruppe 2 $^1/_{1000}$ mg in 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung hatten. Diese verschiedenen Konzentrationen verwandten wir, um die Einwirkung des Serums auf verschiedene Bazillenmengen zu prüfen. Da es uns auf eine möglichst gleichmäßige Bazillenaufschwemmung ankam, zentrifugierten wir die Aufschwemmungen, bevor wir das Serum auf sie einwirken ließen, noch ganz schwach, damit sich noch etwa gröbere Partikelchen niederschlagen konnten. Auf diese Weise erzielten wir eine gleichmäßig homogene Aufschwemmung, in der die Bazillen, wie wir mikroskopisch feststellen konnten, ziemlich gleichmäßig verteilt waren. Auf je 1 ccm dieser Bazillenemulsion ließen wir die gleiche Menge unverdünntes Serum 24 Std. bei 37° im Brutschrank einwirken. Gleichzeitig damit wurden analoge Kontrollversuche mit physiologischer Kochsalzlösung angesetzt. Nach der Bebrütungszeit wurden die Mischungen 10—15 Min. sehr scharf zentrifugiert, die Flüssigkeiten abgegossen, das Zentrifugat mit 2 ccm physiologischer Kochsalzlösung auf die Ursprungsmenge aufgefüllt und so lange geschüttelt, bis wir wieder eine gleichmäßig homogene Bazillenaufschwemmung hatten. Für die Züchtung der Bazillen benutzten wir Petragnani-Nährböden derart, daß wir für jeden mit Serum bzw. Kochsalz behandelten Bazillenstamm 3 Röhrchen mit 0,1 ccm der Bazillenaufschwemmungen beschickten. Die Flüssigkeit wurde gleichmäßig auf den Nährboden verteilt und dieser so lange bei Zimmertemperatur horizontal gelagert, bis die Aufschwemmung eingezogen war; das war meist nach einigen Stunden schon der Fall. Die Menge, die wir jeweils auf ein Petragnani-Röhrchen brachten, entsprach in der ersten Versuchsreihe etwa $^1/_{2000}$ mg, in der 2. Versuchsreihe etwa $^1/_{20000}$ mg.

Die so behandelten Nährböden wurden dann bei 37° bebrütet und täglich kontrolliert. Das erste erkennbare Wachstum, sowie die Zahl der gewachsenen Kolonien der einzelnen Haupt- und Kontrollversuche wurden ausgezählt, solange die Möglichkeit dazu bestand, und tabellenmäßig aufnotiert. Während ein Auszählen in der ersten Versuchsreihe nach einigen Tagen schon unmöglich wurde, konnten in der zweiten Versuchsreihe wegen der geringeren Bazillenkonzentration die Kolonien bis zum Abschluß des Versuches noch gut ausgezählt werden.

Versuch I.

Untersuchung über die bakterizide Kraft der Blutseren von 7 tuberkulösen und 2 normalen Meerschweinchen an 3 verschieden virulenten Tuberkelbazillenstämmen.

Tier Nr.	Tuberkulöse Vor- und Nachbehandlung	Makroskopischer und mikroskopischer Organbefund	Serologisch nachweisbare Antikorper nach Witebsky-Kuhn-Klingenstein	Wachstumshemmende Stoffe im Blutserum
23	Vorbehandlung: 28. 6. 38. Vaselinimpfstoff intraperitoneal: Bauch links Nachbehandlung: 25. 8. 38 $^{1}/_{20\,000\,000}$ mg virulenter M.I. Bauch rechts.	Makroskopischer Befund: Walnußgroßer Vaselinimpfstoffabszeß in der lk. oberen Bauchhöhle. Verwachsungen von Milz, Leber, Magen, Darm und Nieren. Leber und Milz mit flächen- und knötchenhaften fibrösen Auflagerungen. Im Leberparenchym mehrere mit Vaselinimpfstoff durchsetzte gröbere und kleinere Knötchen. Lungen o. B. Histologischer Befund: Leber: Zahlreiche kleinere Zellkerne im Parenchym, neben größeren mit Abszeßchen durchsetzten Vaselinimpfstoffknoten. Milz: Mit einigen fibrotisch-tuberkulösen Follikeln. Lungen: Zahlreiche kleinere und größere Herde mit zentraler Nekrose. Inguinaler Lymphknoten rechts: Bohnengroß verkäst.	++	Stamm I θ Stamm II θ Stamm III θ
41	Vorbehandlung: 28. 6. 38 Vaselinimpfstoff subkutan Bauch links. Nachbehandlung: keine.	Makroskopischer Befund: o. B. Vaselinimpfstoff aus dem Körper vollständig ausgestoßen. Mikroskopischer Befund: Milz und Lungen: o. B. Leber: mit einzelnen locker gebauten Zellherden.	++	Stamm I θ Stamm II θ Stamm III θ
62	Vorbehandlung: wie Nr. 23. Nachbehandlung: 28. 8. 38 $^{1}/_{1\,000\,000}$ mg virulenter M.I. subkutan Bauch rechts.	Makroskopischer Befund: Vgl. Tier 23 Lumbaler Lymphknoten rechts walnußgroß, verkäst. Mikroskopische Untersuchung: Lungen: Mit einzelnen massiven Zellherden. Leber: Mit kleineren und größeren in Zerfall begriffenen Herdbildungen. Milz: nicht untersucht.	++	Stamm I θ Stamm II θ Stamm III θ
129	Vorbehandlung: 28. 6. 38 $^{1}/_{20\,000}$ mg E.M. subkutan Bauch links. Nachbehandlung: 25. 8. 38 $^{1}/_{1\,000\,000}$ mg M.I. subk. Bauch rechts.	Makroskopischer Befund: o. B. Mikroskopische Untersuchung: Milz: Mit einzelnen fibrotischen Follikeln. Leber: o. B. Lungen: o. B.	θ	Stamm I θ Stamm II θ Stamm III θ
147	Vorbehandlung: 28. 6. 38 $^{1}/_{20\,000}$ mg E.M. subkutan Bauch links. Nachbehandlung: 25. 8. 38 $^{1}/_{20\,000\,000}$ mg virulenter M.I. subkutan Bauch rechts	Makroskopischer Befund: Inguinaler Lymphknoten rechts erbsgroß, verkäst. Milz: Mit 2 gröberen Knoten. Leber: o. B. Lungen: o. B. Mikroskopischer Befund: Lungen: Mit mehreren massiven Zellherden. Milz: Mit einzelnen fibrotischen Follikeln. Leber: Mit mehreren fibrotischen Herden.	θ	Stamm I θ Stamm II θ Stamm III θ

Versuch I (Fortsetzung).

Tier Nr.	Tuberkulöse Vor- und Nachbehandlung	Makroskopischer und mikroskopischer Organbefund	Serologisch nachweisbare Antikörper nach Witebsky-Kuhn-Klingenstein	Wachstumshemmende Stoffe im Blutserum
262	Vorbehandlung: keine. Nachbehandlung: 25. 8. 38 $^1/_{20000000}$ mg virulenter M.I. subkut. Bauch rechts.	Makroskopischer Befund: Schwere Organtuberkulose.	θ	Stamm I θ Stamm II θ Stamm III θ
290	Vorbehandlung: keine. Nachbehandlung: 25. 8. 38 $^1/_{1000000}$ mg M.I. subkutan Bauch rechts.	Makroskopischer Befund: Milz: Mit mehreren groben tuberkulösen Herden durchsetzt. Leber: Mit kleinen tuberkulösen Knötchen und Lunge: Mit einzelnen tuberkulösen Knötchen durchsetzt. Mikroskopischer Befund: Lungen: Mit mehreren massiven Herden durchsetzt. Leber: Mit zahlreichen Herdchen durchsetzt. Milz: Nicht untersucht.	θ	Stamm I θ Stamm II θ Stamm III θ
0 und	Normaltiere	Makroskopischer Befund: o. B. Mikroskopischer Befund: o. B.	θ	Stamm I θ Stamm II θ Stamm III θ
0′		Makroskopischer Befund: o. B. Mikroskopischer Befund: o. B.	θ	Stamm I θ Stamm II θ Stamm III θ

Das Resultat der Untersuchung ist kurz zusammengefaßt folgendes: Das erste Bazillenwachstum zeigte sich im Versuch I nach 14, das erste im Versuch II nach 18 Tagen. In allen Versuchen war weder eine Verzögerung im Wachstum noch ein numerisch wahrnehmbarer Unterschied in der Kolonienzahl des Hauptversuches beim Vergleich mit dem Kontrollversuche nachzuweisen. In den 20 geprüften Seren waren also bei der von uns angewandten Versuchsanordnung wachstumshemmende Stoffe weder bei den Tieren mit chronisch und rasch fortschreitenden tuberkulösen Prozessen noch bei den Immun- und Normaltieren festzustellen. Diese Ergebnisse stimmen mit den im Robert Koch-Institut festgestellten überein.

Wertet man das Ergebnis der Untersuchungen im Rahmen der Immunitätsversuche aus, so läßt sich feststellen, daß von den 5 mit dem Vaselinimpfstoff immunisierten Tieren nach der Superinfektion nur Tier Nr. 33 einen guten Immunitätszustand aufwies. Bei den übrigen 4 Tieren aus dieser Gruppe konnte sowohl makro- wie auch mikroskopisch das Angehen und Fortschreiten der virulenten Nachinfektion festgestellt werden. Während bei diesen 4 Tieren reichlich komplementbindende Antikörper nachgewiesen werden konnten, war ihr Nachweis bei Tier 33 zweifelhaft.

Von den 4 mit dem schwachvirulenten Bazillenstamm E.M. immunisierten Tieren, die ebenfalls später superinfiziert wurden, zeigte nur Tier 147 eine deutliche Wirkung der Superinfektion. Die übrigen Tiere aus dieser Gruppe wiesen einen günstigen Immunitätszustand auf. Bei dieser Tiergruppe ließen sich komplementbindende Antikörper nicht nachweisen.

Versuch II.

Untersuchung über die bakterizide Kraft der Blutseren von 9 tuberkulösen und 2 normalen Meerschweinchen an einem virulenten Misch-Impfstoff.

Tier Nr.	Tuberkulöse Vor- und Nachbehandlung	Makroskopischer und mikroskopischer Organbefund	Serologisch nachweisbare Antikorper nach Witebsky-Kuhn-Klingenstein	Wachstums-hemmende Stoffe im Blutserum
33	Vorbehandlung: 27. 6. 38 Vaselinimpfstoff subkutan Bauch links. Nachbehandlung: 25. 8. 38 Superinfektion $^1/_{20\,000\,000}$ mg M.I. subkutan Bauch rechts.	Makroskopischer Befund: In der Bauchdecke links ein taubeneigroßer Abszeß (Impfstoff), in dem noch massenhaft Tb.-Bazillen nachgewiesen wurden. Organbefund: o. B. Mikroskopischer Befund: Lunge: Einzelne kleine massive Zellherdchen. Leber: o. B. Milz: o. B.	±	θ
67	Vorbehandlung: wie Tier Nr. 33. Nachbehandlung: 25. 8. 38 Superinfektion $^1/_{1\,000\,000}$ mg M.I. subkutan Bauch rechts.	Makroskopischer Befund: Nur noch geringe Ueberreste des Erstimpfstoffes in Form kleiner Impfstoffabszesse in der linken Bauchdecke. Milz: Mit 2 tuberkulösen Knötchen. Leber: Mit einzelnen tuberkulösen Herden Lungen: o. B. Mikroskopischer Befund: Lungen: Einzelne bereits größere massive Herde mit beginnender Fibrose. Leber: Mit mehreren Herden. Milz: Mit tuberkulös veränderten Follikeln 1,1 g.	++	θ
72	Vorbehandlung: wie Tier 33 u. 67. Nachbehandlung: wie Tier Nr. 67.	Makroskopischer Befund: Impfstoff völlig aus dem Organismus ausgestoßen. Nur leichte strangartige Verwachsungen zwischen Bauchhaut und Bauchdecken links. Milz: 1,3 g, mit zahlreichen tuberkulösen Knötchen. Leber: Mit einzelnen tuberkulösen Herden Lungen: Mit einem größeren zentral-verkästen Knoten. Mikroskopischer Befund: Lungen: Mehrere kleinere und größere massive Herdbildungen. Milz: Mit mehreren tuberkulös veränderten Follikeln. Leber: Mehrere kleinere und bereits größere Zellherde.	++	θ
98	Vorbehandlung: 28. 6. 38 $^1/_{20\,000}$ mg E.M. subkutan Bauch links Nachbehandlung: 25. 8. 38 $^1/_{1\,000\,000}$ mg M.I. subkutan Bauch rechts.	Makroskopischer Befund: o. B. Mikroskopischer Befund: o. B.	θ	θ

Versuch II (Fortsetzung).

Tier Nr.	Tuberkulose Vor- und Nachbehandlung	Makroskopischer und mikroskopischer Organbefund	Serologisch nachweisbare Antikörper nach Witebsky-Kuhn-Klingenstein	Wachstumshemmende Stoffe im Blutserum
139	Vorbehandlung: wie Tier Nr. 98 Nachbehandlung: 25. 8. 38 $^1/_{20\,000\,000}$ M.I. subkutan Bauch rechts.	Makroskopischer Befund: o. B. Mikroskopischer Befund: Lungen: Einzelne kleine massive Zellherdchen. Leber: Mit einzelnen kleinen Zellknötchen. Milz: Nur leichte fibrotische Veränderungen einzelner Follikel.	θ	θ
260	Vorbehandlung: keine. Nachbehandlung: 25. 8. 38 $^1/_{20\,000\,000}$ mg M.I. subkutan Bauch rechts.	Makroskopischer Befund: Inguinaler Lymphknoten rechts: bohnengroß fibrös. Milz: 1,2 g o. B. Leber: o. B. Lungen: o. B. Mikroskopischer Befund: Milz: Mit geringen tuberkulösen Veränderungen an den Follikeln. Leber: Einzelne kleine Herdbildungen. Lungen: Fragliche tuberkulöse Veränderungen.	θ	θ
286	Vorbehandlung: keine. Nachbehandlung: 25. 8. 38 $^1/_{20\,000\,000}$ mg M.I. subkutan Bauch rechts.	Makroskopischer Befund: Leicht vergroßerte inguinale Lymphknoten rechts. Milz, Leber, Lungen: o. B. Mikroskopischer Befund: Leber, Milz: o. B. Lungen: Mit einzelnen massiven Zellherden.	θ	θ
175	Vorbehandlung: 28. 6. 38 $^1/_{20\,000}$ mg E.M. subkutan Bauch links. Nachbehandlung: keine.	Makroskopischer Befund: o. B. Mikroskopischer Befund: Leber, Milz: Mit einzelnen kleinen tuberkulösen Herden. Lungen: Mit fraglichen tuberkulösen Einzelherden.	θ	θ
176	wie Tier Nr. 175.	Makroskopischer Befund: o. B. Mikroskopischer Befund: o. B.	θ	θ
0 und	Normaltiere	Makroskopischer Befund: o. B. Mikroskopischer Befund: o. B.	θ	θ
0′		Makroskopischer Befund: o. B. Mikroskopischer Befund: o. B.	θ	θ

Von den Kontrolltieren zur Superinfektion hatte Tier 262 eine schwere und Tier 290 eine mittelschwere Organtuberkulose, während die Tiere 260 und 286 nur geringe Anzeichen einer tuberkulösen Infektion aufwiesen. Von den E.M.-Kontrolltieren ließen sich nur bei Tier 175 geringe Spuren einer tuberkulösen Infektion histologisch nachweisen. Tier 176 hatte die E.M.-Infektion völlig überwunden. Komplementbindende Antikörper waren weder bei den E.M.- noch bei den Superinfektionskontrolltieren nachweisbar.

Zusammenfassung.

1) Komplementbindende Antikörper sind im Blutserum tuberkulöser Meerschweinchen nicht immer nachweisbar. Aus ihrer An- bzw. Abwesenheit

im Serum lassen sich keinerlei Schlüsse über den Ablauf der tuberkulösen Erkrankung beim Meerschweinchen ziehen.

2) Zwischen komplementbindenden Antikörpern und der Entwicklung eines Immunitätszustandes bei der Tuberkulose des Meerschweinchens besteht kein Zusammenhang.

3) Im Blutserum von normalen, immunisierten und tuberkulösen Meerschweinchen mit verschieden rasch fortschreitenden Prozessen — auch wenn in ihrem Serum komplementbindende Antikörper enthalten sind — lassen sich keine wachstumshemmenden Stoffe verschieden virulenten Tuberkelbazillenstämmen gegenüber mit der von uns angewandten Untersuchungsmethode nachweisen. Das Ergebnis dieses Versuches spricht gegen die humorale Theorie der Immunität bei der Tuberkulose.

Schrifttum.

Courmont, Paul und Gardère, C. r. Soc. Biol. Paris **105**, 8—9 (1930); Ref. Zbl. Tbk.-forschg **28**, 589 u. **45**, 698. — Angelesio, Ref. Zbl. Tkb.forschg **34**, 450 (1931). — Sonak, Zbl. Bakter. I Orig. **115**, 173—177 (1930). — Hedvall, Ref. Zbl. Tbk.forschg **43**, 724 (1936). — Kuteischikow, Z. Immun.forschg **66**, 261. — Yabushita, Mitt. med. Ges. Tokyo **49**, 1049 (1935). — Pagel, Tubercle **26**, Nr. 6 (1935).

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität Bonn (Direktor: Prof. Dr. med. H. Selter).]

Ueber die Bedeutung der Antikörper bei der Tuberkulose und den Wert der serologischen Untersuchungsmethoden, unter besonderer Berücksichtigung der experimentellen Meerschweinchentuberkulose.

Von Dr. A. Nagel,
Assistent am Institut.

Der Wert der verschiedenen serologischen Untersuchungsmethoden bei den tuberkulösen Erkrankungen des menschlichen und tierischen Organismus in diagnostischer, prognostischer und immunbiologischer Beziehung ist trotz der seit den letzten Jahren verbesserten Antigene noch stark umstritten. Heymer und Schulte-Tigges stellten an ihrem klinischen Untersuchungsmaterial fest, daß selbst bei Verwendung ein und desselben Antigens verschiedener Sendungen die serologischen Reaktionen sehr häufig kein einheitliches Resultat ergeben; noch größere Differenzen in der Auswertung der Ergebnisse lassen sich bei Ausführung der verschiedenen Untersuchungsmethoden nachweisen. Von vielen Serologen werden die komplementbindenden Methoden

bevorzugt, da sie nach ihrer Angabe den größten Grad an Spezifität erreichen. Von diesen wieder soll die mit dem Witebsky-Kuhn-Klingensteinschen Antigen durchgeführte mit am besten brauchbar sein. Auch Weiland hat in vergleichenden Untersuchungen an Meerschweinchen diese Methode als die zuverlässigste für den Nachweis der Antikörper im Meerschweinchenserum angegeben.

Die Frage nach der Natur und Entstehung der Antikörper bedarf ebenso wie die der Reaktion in vitro noch einer Aufklärung. Die Annahme zahlreicher Autoren, es handele sich bei letzterer um eine Antigen-Antikörper-Reaktion, wird von anderen Forschern bestritten. Diese glauben, daß der Reaktion eine Kolloidlabilität des Serums zugrunde liege. Erfahrungsgemäß besteht jedoch zwischen serologischen Tuberkulosereaktionen und Serumlabilität keine absolute Parallelität; denn es gibt einerseits zahlreiche Fälle, wo bei bestehender Serumlabilität (beschleunigte Senkungsgeschwindigkeit) die serologischen Untersuchungsergebnisse negativ sind, während andererseits bei Seren mit normaler Senkungsgeschwindigkeit der Antikörpernachweis positiv ausfällt (Klingenstein).

Für die Spezifität der Antikörper würden allerdings die Absättigungsversuche von Meinicke und Aoki sprechen. Ueber die Entstehung der Antikörper gehen die Meinungen ebenfalls auseinander. Pfannenstiel glaubt, daß diese als komplexe Reaktionsprodukte aufzufassen sind, die bei dem Kampf des Tb-Bazillus mit dem Organismus entstehen. Pesch, der in vergleichenden Untersuchungen u. a. mit der von Guillery angegebenen bakteriendichten Schilfsäckchenmethode Immunisierungsversuche an Kaninchen durchführte und gleichzeitig bei den Versuchstieren mit dem Neuberg-Klopstockschen Antigen den Nachweis auf komplementbindende Antikörper führte, nimmt an, daß die Bildung der Antikörper durch Leibessubstanzen der Tb-Bazillen, wahrscheinlich den Phosphatiden, hervorgerufen werde. „Erst beim Zerfall der abgestorbenen Tb-Bazillen treten diese in Wirkung und führen zur Bildung komplementbindender Antikörper.“ Mit den in Schilfsäckchen eingeschlossenen Tb-Bazillen konnte Pesch wohl eine Allergie, jedoch keine Antikörper nachweisen.

Nach den Untersuchungsergebnissen zahlreicher Autoren ist der Nachweis der komplementbindenden Antikörper im tuberkulösen Organismus bei Tier und Mensch sehr unregelmäßig. Häufig lassen sich bei klinisch, in der Mehrzahl der Fälle allerdings schwer tuberkulösen Erkrankungen keine Antikörper nachweisen, während sie oft bei klinisch völlig Gesunden im Serum zu finden sind. Weiland konnte bei Meerschweinchen, die mit einer 100fach tödlichen Dosis geimpft waren, in den ersten 4 Monaten in 45 Proz., nach längerer Zeit in 65 Proz. der Fälle Antikörper nachweisen. Bei zahlreichen anderen Erkrankungen, wie Diphtherie, Lepra, Malaria, Rheumatismus, Asthma bronchiale, lassen sich in einem gewissen Hundertsatz nach den verschiedenen serologischen Untersuchungsmethoden ebenfalls Antikörper nachweisen.

Bei insgesamt 39 Fällen verschiedener klinischer Erkrankungen, die uns von mehreren Krankenanstalten liebenswürdigerweise zur Verfügung gestellt wurden, haben wir mit dem Blutserum der Kranken verschiedene Tb-Reaktionen durchgeführt und vergleichende Untersuchungen angestellt. Von der nur geringen Erkrankungszahl lautete die Diagnose 18mal auf Rheumatismus, 8mal auf Asthma bronchiale, 8mal auf Ischias, 3mal auf Arthrosis deformans, 1mal auf Erythema nodosum und 1mal auf allergische Rhinitis. Die Auswahl dieser Krankheiten wurde deshalb getroffen, weil gerade bei ihnen nach zahlreichen Mitteilungen die serologischen Untersuchungen häufiger positiv zu sein pflegen. Tuberkulöse Erkrankungen wurden vorher mit den üblichen kli-

Tabelle I.
Art und Zahl der klinischen Erkrankungen sowie die durchgeführten serologischen Untersuchungsmethoden.

Art und Zahl der Erkrankungen	Komplementbindungsmethode nach Witebsky-Kuhn-Klingenstein	Meinicke-Kuppungsreaktion	Komplementbindungsmethode nach Besredka
Akuter u. chronischer Gelenkrheumatismus 18 Fälle (Nr. 1—18)	Untersucht wurden 18 Falle; davon waren: 15 θ 2 ++ (Nr. 3 u. 11) 1 + (Nr. 15)	Untersucht wurden 18 Falle; davon waren: 14 θ 4 + (Nr. 4, 6, 7 und 16)	Untersucht wurden 5 Falle; davon waren: 1 θ 1 ++ (Nr. 3) 2 + (Nr. 1 u. 5) 1 ± (Nr. 4)
Asthma bronchiale 8 Fälle (Nr. 19—26)	Untersucht wurden 8 Falle; davon waren: 8 θ	Untersucht wurden 6 Falle; davon waren: 3 θ 3 + (Nr. 19, 20 und 21)	—
Ischialgien 8 Falle (Nr. 27—34)	Untersucht wurden 8 Falle; davon waren: 1 ++ (Nr. 28) 1 + (Nr. 31) 6 θ	Untersucht wurden 8 Fälle; davon waren: 8 θ	Untersucht wurde 1 Fall; dieser war: 1 + (Nr. 27)
Arthrosis deformans 3 Falle (Nr. 35—37)	Untersucht wurden 3 Falle; davon waren: 2 ++ (Nr. 35 u. 36) 1 θ	Untersucht wurden 3 Falle; davon waren: 3 θ	—
Erythema nodosum 1 Fall	1 θ	1 θ	—
Allergische Rhinitis 1 Fall	1 θ	1 θ	—

nischen Untersuchungsmethoden ausgeschlossen. An serologischen Reaktionen wurden die komplementbindende Methode von Witebsky-Kuhn-Klingenstein, die Meinicke-Kuppungsreaktion und bei einem Teil der Fälle auch die komplementbindende Methode nach Besredka ausgeführt. Aus obenstehender Tabelle I sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen zu entnehmen. In 18 von 39 untersuchten Seren ließen sich ebenfalls komplementbindende Antikörper nachweisen, ohne daß irgendwelche Anhaltspunkte für eine tuberkulöse Erkrankung bestanden. Uebereinstimmende Resultate beim Vergleich der verschiedenen Methoden konnten jedoch nur in einem einzigen Fall, bei Nr. 3, zwischen der Witebsky-Kuhn-Klingensteinschen und der Besredkaschen Methode erzielt werden. Die Patientin, von der das Blut stammte, litt seit Jahren an einem chronischen Rheumatismus mit starker Kontrakturstellung der Gelenke. Obgleich sich eine Anzahl der Kliniker, gestützt durch die positiven Ergebnisse ihrer serologischen Untersuchungen (Reitter, Brand, Kutschera usw.) z. B. beim Rheumatismus für dessen tuberkulöse Aetiologie einsetzen, darf man wohl nicht fehlgehen in der Annahme, daß es sich bei den positiven Ergebnissen dieser Reaktionen in den meisten Fällen um unspezifische Ausschläge handelt. Von zahlreichen Untersuchern ist wiederholt darauf hingewiesen worden, daß zwischen Antikörperbildung und Immunitätsleistung des tuberkulösen Organismus kein ursächlicher Zusammenhang besteht. Trotzdem ist man vielfach in klinischen Kreisen

Tabelle II.

Tierzahl	Art der Erstinfektion am 27. Juni 1938	Art der Superinfektion am 25. August 1938	Makroskopischer Befund	W.K.K.
39	50 mg abgetoteter virulenter M.I. in einem ccm flüssiger steriler Vaseline, teils subkutan, teils subkutan u. intraperitoneal teils intraperitoneal Bauch links			
	Subkutan (a) 2 Tiere Nr. 17	$^1/_{20\,000\,000}$ mg vir. M.I. subkut. Bauch rechts	+	+
	„ 68	$^1/_{1\,000\,000}$ mg vir. M.I. subkut. Bauch rechts	++	
	13 Tiere:			++
	3 Tiere subkutan (a) Nr. 43	$^1/_{1\,000\,000}$ mg vir. M.I. subkutan Bauch rechts	θ	
	„ 67		+	
	„ 72		++	
	1 Tier subkutan (na) Nr. 7	$^1/_{20\,000\,000}$ mg vir. M.I. subkut. Bauch rechts	+	
	5 Tiere, teils subkutan (a), teils intraperitoneal Nr. 62	$^1/_{1\,000\,000}$ mg vir. M.I. subkut. Bauch rechts	+	
	„ 31	$^1/_{20\,000\,000}$ mg vir. M.I. subkut. Bauch rechts	θ	
	(K) „ 36	keine	θ	
	„ 48	$^1/_{1\,000\,000}$ mg vir. M.I. subkut. Bauch rechts	+	
	„ 3	$^1/_{20\,000\,000}$ mg vir. M.I. subkut. Bauch rechts	θ	
	4 Tiere intraperitoneal Nr. 22	$^1/_{20\,000\,000}$ mg vir. M.I. subkut. Bauch rechts	++	
	„ 23	$^1/_{20\,000\,000}$ mg	++	
	„ 26	$^1/_{20\,000\,000}$ mg	++	
	„ 69	$^1/_{1\,000\,000}$ mg	θ	
	14 Tiere: 9 subkutan 6 (a); 3 (R) 5 teils subkut. (a) teils intraperitoneal			+++
	subkutan (a) Nr. 21	$^1/_{20\,000\,000}$ mg vir. M.I. subkut. Bauch rechts	θ	
	„ 24	$^1/_{20\,000\,000}$ mg	θ	
	„ 30	$^1/_{20\,000\,000}$ mg	θ	
	(K) „ 41	keine	θ	
	„ 53	$^1/_{1\,000\,000}$ mg vir. M.I. subkut. Bauch rechts	+++	
	„ 70	$^1/_{1\,000\,000}$ mg	+	
	subkutan (R) „ 13	$^1/_{20\,000\,000}$ mg vir. M.I. subkut. Bauch rechts	+	
	„ 15	$^1/_{20\,000\,000}$ mg	θ	
	„ 56	$^1/_{1\,000\,000}$ mg	θ	
	5 teils subkutan, teils intraperitoneal Nr. 12	$^1/_{1\,000\,000}$ mg vir. M.I. subkut. Bauch rechts	++	
	„ 27		+	
	„ 37		θ	
	„ 46		+++	
	„ 57		θ	
	6 Tiere intraperitoneal „ 5	$^1/_{20\,000\,000}$ mg M.I. subkutan Bauch rechts	θ	(E)
	„ 16	$^1/_{20\,000\,000}$ mg	θ	
	„ 39	$^1/_{1\,000\,000}$ mg	+++	
	„ 45	$^1/_{1\,000\,000}$ mg	θ	
	„ 61	$^1/_{1\,000\,000}$ mg	θ	
	„ 65	$^1/_{1\,000\,000}$ mg	++	
	1 Tier Impfstoff intramuskulär in die rechte Bauchdecke Nr. 33	$^1/_{20\,000\,000}$ mg M.I. subkutan Bauch rechts	θ	±
	3 Tiere Impfstoff ohne Vaseline teils subkutan (a), teils intraperitoneal (K) Nr. 73	keine	θ	++
	(K) „ 74			
	(K) „ 75			

Zeichenerklärung (Makroskopischer Befund): + = Nachweis der tuberkulösen Superinfektion nur an der Injektionsstelle und den regionären Lymphknoten; ++ = Uebergreifen der S-Infektion auf die parenchymatösen Organe mit nur mäßiger Herdbildung; +++ =

sehr geneigt, dem Antikörpergehalt des Serums vor allem in prognostischer Beziehung eine große Bedeutung beizumessen.

Innerhalb verschiedener Immunitätsversuchsreihen an Meerschweinchen haben wir außerdem das Blut von insgesamt 102 verschieden infizierten Tieren, die in Abständen getötet wurden, auch auf ihren Gehalt an Antikörpern nach der Witebsky-Kuhn-Klingensteinschen Methode untersucht, um die Zusammenhänge zwischen Immunitätseffekt des Organismus und den serologisch nachweisbaren Antikörpern festzustellen.

Von den 102 Tieren stammten 39 aus einer Versuchsreihe, die am 27. 6. 38 mit einem Vaselinimpfstoff (50 mg abgetöteter, virulenter Mischimpfstoff in 1 ccm steriler flüssiger Vaseline) zur Erzielung eines Immunitätszustandes teils subkutan, teils intraperitoneal vorbehandelt waren. 39 Tiere gehörten einer Gruppe an, die am gleichen Tage mit $^1/_{20\,000}$ mg des schwach virulenten Bazillenstammes E.M. subkutan aus dem gleichen Grunde injiziert waren. Die übrigen Tiere stammten aus den Kontrollgruppen zum Superinfektionsimpfstoff. Am Tage der Superinfektion (25. 8. 38) wurden aus den ersten beiden Versuchsgruppen jeweils 5 Kontrolltiere getötet, und der Gehalt des Serums an komplementbindenden Antikörpern vor der Superinfektion festgestellt. Bei den Tieren aus der 1. Gruppe ließen sich in jedem Falle komplementbindende Antikörper nachweisen (Witebsky-Kuhn-Klingenstein durchschnittlich ++ bis +++). Bei allen E.M.-Tieren fielen die serologischen Untersuchungen negativ aus. Jeweils die Hälfte der Tiere aus den beiden ersten Versuchsreihen wurden 8 Wochen nach der Erstinfektion mit $^1/_{20\,000\,000}$ bzw. mit $^1/_{1\,000\,000}$ mg eines mäßig virulenten Mischimpfstoffes superinfiziert.

Tabelle III.

Tierzahl	Art der Erstinfektion am 27. Juni 1938	Art der Superinfektion am 25. August 1938	Makroskopischer Befund	W.K.K.
39	Subkutan $^1/_{20\,000}$ mg E.M. Bauch links			
	24 Tiere; davon waren: 14	$^1/_{1\,000\,000}$ mg M.I. subkutan Bauch rechts	2mal + 12mal θ	θ
	10	$^1/_{20\,000\,000}$ mg M.I. subkutan Bauch rechts	2mal + 8mal θ	θ
	1 Tier: Nr. 111	$^1/_{1\,000\,000}$ mg M.I. subkutan Bauch rechts	θ	+
	5 Tiere: Nr. 121	$^1/_{20\,000\,000}$ mg M.I. subkutan Bauch rechts	+	++
	„ 134		θ	
	„ 146		++	
	„ 130		θ	
	„ 133		θ	
	3 Tiere: Nr. 107	$^1/_{1\,000\,000}$ mg M.I. subkutan Bauch rechts	+	±
	„ 128	$^1/_{20\,000\,000}$ mg M.I. subkutan Bauch rechts	θ	
	„ 150	$^1/_{20\,000\,000}$ mg M.I. subkutan Bauch rechts	+	
	5 Tiere Kontrollen	keine	θ	θ
	1 Tier	$^1/_{20\,000\,000}$ mg M.I. subkutan Bauch rechts	θ	(E)

Organtuberkulose stärkeren Grades; ++++ = Schwerste Organtuberkulose; (a) = Impfstoff aus dem Organismus ausgestoßen; (R) = Noch geringe Reste des Impfstoffes im Körper nachweisbar; M.I. = Mischimpfstoff aus zwei verschiedenen virulenten Tb.-Stämmen; W.K.K. = Komplementbindungsreaktion nach Witebsky-Kuhn-Klingenstein; (E) = Eigenhemmung; K = Kontrollen; (na) = Impfstoff nicht abgestoßen.

Tabelle IV.

Tierzahl	Art der Erstinfektion am 27. Juni 1938	Art der Superinfektion am 25. August 1938	Makroskopischer Befund	W.K.K.
23	keine			
	13 Tiere	$^1/_{20000000}$ mg vir. M.I. subkutan Bauch rechts	3mal + 3mal ++ 1mal ++++ 1mal θ	θ
			1mal ++ 1mal ++++	+
			1mal + 1mal ++++	±
			1mal ++++	(E)
	10 Tiere	$^1/_{1000000}$ mg vir. M.I. subkutan Bauch rechts	3mal + 4mal ++ 1mal ++++ 1mal θ	θ
			1mal ++	++

Aus den vorstehenden Tabellen lassen sich die einzelnen Ergebnisse des bis zu einem Zeitraum von 8½ Monaten durchgeführten Versuches entnehmen. Im folgenden sind die Resultate kurz zusammengefaßt.

Während sich nicht nur bei den 5 Kontrolltieren, sondern auch bei 33 von 34 superinfizierten Tieren der Vaselinimpfstoffgruppe im Verlaufe des Versuches komplementbindende Antikörper regelmäßig bestimmen ließen, konnte ihr Nachweis bei den übrigen Versuchsgruppen nur in einer bei weitem geringeren Anzahl geführt werden. Oft bestand zwischen Antikörpertiter und pathologisch-anatomischem Sektionsbefund kein sichtbarer Zusammenhang.

Man kann wohl mit Sicherheit annehmen, daß nicht nur bei den 5 Kontrolltieren, sondern auch bei allen anderen Tieren aus der Vaselinimpfstoffgruppe die serologischen Untersuchungsergebnisse schon vor der Superinfektion positiv ausgefallen wären, wenn man den Antikörpernachweis zu diesem Zeitpunkt weiter durchgeführt hätte. Bei den mit dem E.M.-Impfstoff vorbehandelten Tieren darf man, trotz des gegenteiligen Ausfalls der serologischen Reaktionen bei den Kontrolltieren, einen negativen serologischen Befund am Tage der Superinfektion nicht unbedingt voraussetzen. Denn erfahrungsgemäß ruft der E.M.-Bazillus in der bei uns üblichen Impfdosis von $^1/_{20000}$ mg hier und da tuberkulöse Herdbildungen hervor, die in der Mehrzahl der Fälle zwar abheilen, aber immerhin vorübergehend zur Antikörperbildung Anlaß geben können, da ja sicherlich die Reizstärke, die zur Bildung der Antikörper anregt, in den verschiedenen Organismen mehr oder weniger starken individuellen Schwankungen unterworfen ist. Diese lassen sich im voraus jedoch nicht bestimmen. Trotzdem kann man, ohne einen größeren Rechenfehler zu begehen, annehmen, daß im Serum der größten Zahl der superinfizierten E.M.-Tiere Antikörper vor der Superinfektion nicht vorhanden waren. Von 34 superinfizierten Tieren wurden im Verlaufe des Versuches nur in 6 Fällen komplementbindende Antikörper nachgewiesen (W.K.K. 5mal ++, 1mal +); in 3 Fällen war der Befund zweifelhaft. Von den 6 positiven, serologischen Untersuchungsergebnissen stimmten 2 (Nr. 121 u. 146) mit dem makroskopisch-pathologischen Befund

überein. Bei den übrigen 4 Tieren konnten tuberkulöse Veränderungen mit dem bloßen Auge nicht nachgewiesen werden; dagegen fanden sich bei diesen Tieren, wie bei zahlreichen anderen in den parenchymatösen Organen hier und da histologisch nachweisbare, zum Teil fibrotische tuberkulöse Herdchen, die sicherlich mit der Antikörperbildung in Zusammenhang gebracht werden können.

Sehr unbefriedigend waren die serologischen Untersuchungsergebnisse bei den Kontrollgruppen zum Superinfektionsimpfstoff, wenn man sie mit den pathologisch-anatomischen Sektionsbefunden vergleicht. Von 23 untersuchten Seren konnten trotz der in 21 Fällen bestehenden aktiven tuberkulösen Erkrankungen nur 3mal komplementbindende Antikorper nachgewiesen werden; 2mal war der Befund zweifelhaft; 1mal zeigte sich bei schwerster Organtuberkulose eine Eigenhemmung des Serums. Bei der teilweise nur geringen Superinfektionsdosis und dem mäßig virulenten Mischimpfstoff hatte sich nur bei 5 Tieren eine schwere Organtuberkulose entwickelt; 6 Tiere zeigten eine mittelschwere, 7 Tiere eine leichte, und 2 keine Anzeichen einer tuberkulösen Erkrankung. Eine Uebereinstimmung des Sektionsbefundes mit dem serologischen Ergebnisse konnte in einem Fall festgestellt werden (Tier Nr. 291). In einem weiteren Fall konnte bei schwerer Organtuberkulose ein Antikörpertiter von + nachgewiesen werden. In den zweifelhaften Fällen der serologischen Untersuchungen bestand einmal eine schwere tuberkulöse Organerkrankung, bei dem 2. Tier waren makroskopisch nur geringe Zeichen von Tuberkulose vorhanden.

Die Resultate dieser Tierversuche in bezug auf die Verwendbarkeit der serologischen Untersuchungsmethoden in prognostischer und diagnostischer Hinsicht bei derartig durchgeführten Tierexperimenten sind sehr ungünstig. Von mehreren Forschern wurden allerdings bei anderer Versuchsanordnung schon günstige e Resultate erzielt. Wollte man sich aus den serologischen Untersuchungsmethoden allein ein Bild über den Entwicklungsgrad der tuberkulösen Erkrankung im Tierorganismus machen, so käme man, wie die vergleichenden Untersuchungen zeigen, zu einem Ergebnis, das den Tatsachen nur schlecht entsprechen würde. Im Rahmen der verschiedenen Immunitätsversuchsreihen läßt sich jedoch das Ergebnis der serologischen Untersuchungen insofern im positiven Sinne verwerten, als es über die Bedeutung der Antikörper in bezug auf die Immunitätsleistung Aufschluß gibt. In der Vaselineimpfstoffgruppe hatte sich nämlich trocz der Anwesenheit zahlreicher Antikörper im Serum bei 18 von 34 superinfizierten Tieren eine zum Teil schwere Organtuberkulose entwickelt. Von diesen 18 Meerschweinchen zeigten 8, deren Lebensdauer durchschnittlich 4,2 Monate betrug, nur geringe Zeichen der tuberkulösen Superinfektion, 7, deren Lebensdauer durchschnittlich auf 5,6 Monate bemessen war, wiesen eine mittelschwere Organtuberkulose auf, und bei 3 Tieren mit einer durchschnittlichen Lebensdauer von 6,5 Monaten hatte sich eine schwere Organtuberkulose entwickelt. Bei 16 Tieren mit einer Lebensdauer von durchschnittlich 3,4 Monaten ließ sich die Entwicklung der Superinfektion makroskopisch nicht feststellen.

Von den 34 mit $^1/_{20\,000}$ mg E.M. vorbehandelten und gleichsinnig wie die Vaselintiere superinfizierten Meerschweinchen wiesen trotz fehlender Antikörper nur 8 Zeichen einer geringen tuberkulösen Erkrankung auf. Aus dieser Tatsache läßt sich schließen, daß komplementbindende Antikörper, auch wenn sie in großer Zahl bereits vor einer virulenten Superinfektion im Serum vorhanden sind, die Entwicklung einer Organtuberkulose nicht verhindern können, und daß sie auf die Vitalität der Tuberkelbazillen, auch wenn diese nur in ganz geringer Anzahl und mäßiger Virulenz injiziert werden, keinen Einfluß haben.

Die Immunitätsleistung steht mit der Antikörperbildung in keinem ursächlichen Zusammenhang.

Ueber die Entstehung der Antikörper selbst läßt sich aus den Versuchen Sicheres nicht aussagen. Die Regelmäßigkeit, mit der sie im Serum der Tiere aus der Vaselineimpfstoffgruppe bestimmt werden konnten, läßt besonders bei Betrachtung der subkutan geimpften Tiere daran denken, daß sie im Sinne Peschs als Reaktionskörper auf die Zerfallsprodukte der Bazillenleiber aufzufassen sind. Wie Kontrolluntersuchungen ergaben, wurden nämlich die Bazillen von den Leukozyten am Orte der Injektion, wo es teilweise zu taubeneigroßen Abszeßbildungen kam, mehr oder weniger schnell abgebaut und resorbiert; zum Teil wurden sie auch, besonders auffallend bei der intraperitonealen Impfung, in die parenchymatösen Organe verschleppt, in denen sich dann kleine, tuberkulöse Granulome entwickelten, die jedoch abheilten und später nicht mehr nachweisbar waren. Diese Beobachtung berechtigt zu der Annahme, daß bei der Bildung der tuberkulösen Antikorper nicht nur Bazillensubstanzen, sondern auch Reaktionsprodukte des Organismus beteiligt sind, die die Auffassung Pfannenstiels von den komplexen Reaktionskörpern rechtfertigen würde. Ist die Produktion einmal in Gang gebracht, so hält sie teilweise mit unverminderter Stärke noch eine Zeitlang an, auch wenn, wie mehrere Untersuchungsergebnisse zeigten, das Antigen völlig aus dem Organismus ausgestoßen ist.

Vielleicht genügt jedoch der geringe Reiz des hier und da noch spärlich vorhandenen tuberkulösen Gewebes, in Form geringer, strangartiger Verwachsungen zwischen Haut und Bauchdecke an der Injektionsstelle, bzw. die geringen tuberkulösen Herdbildungen in den parenchymatösen Organen, um die einmal in Gang befindliche Antikörperproduktion wachzuhalten. Inwieweit der unspezifische Reiz der Vaseline einen Einfluß auf die Antikörperbildung hat, ließ sich im Versuch nicht feststellen, da auch 3 Kontrolltiere, denen der abgetötete Impfstoff ohne Vaseline injiziert wurde, den gleichen Antikörpertiter im Serum aufwiesen.

Zusammenfassung.

Ueberschaut man die Ergebnisse dieser Untersuchungen, so kommt man zu der Erkenntnis, daß den serologischen Untersuchungsmethoden heute noch nicht die Bedeutung wie denen bei der Lues zukommt. In differentialdiagnostischer Beziehung kann ihnen ein gewisser Wert nicht abgesprochen werden. Ob sie für Reihenuntersuchungen später einmal in Frage kommen, muß die weitere Erfahrung lehren. Für die experimentelle Tierforschung ist sie nach den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen ebenfalls nur sehr beschränkt brauchbar. Die noch zu unregelmäßigen und unsicheren Ergebnisse beweisen, daß der Grad einer genügenden Spezifität weder bei den Flockungs- noch bei den Komplementbindungsreaktionen, trotz der verbesserten Antigene, erreicht wird.

Zum Schluß ist es mir eine angenehme Pflicht, der technischen Assistentin der serologischen Abteilung, Frl. Margot Fudickar für die Ausführung der serologischen Reaktionen, sowie Herrn Dr. Groß von den Städt. Krankenanstalten in Ludwigshafen und Herrn Dr. Lauerburg, vom Krankenhaus in Beuel für die freundliche Uebersendung des Patientenblutes meinen herzlichen Dank auszusprechen.

Schrifttum.

Heymer-Schulte-Tigges, Münch. med. Wschr. **1936**, Nr 42. — Brandt, Kutschera, Beitr. Klin. Tbk. **89**, H. 5 (1935). — Weiland, Klin. Wschr. **1936**, Nr 28. — Ders., Z. Immun.forschg **88**, 104 (1936). — Ders., Munch. med. Wschr. **1932**, Nr 47. — Muth, H., Diss. Bonn, 1937. — Witebsky, Erg. d. ges. Tbk.-Forschung **5**, 125 (1933). — Pesch, Z. Tbk. **65**.

[Aus dem Mikrobiologischen Institut der Kaiserlichen Universität zu Kyoto (Direktor: Prof. Dr. Ren Kimura).]

Ueber das seltene Vorkommen des bovinen Typus von Tuberkelbazillen bei Japanern.

Von Ren Kimura und Hisashi Kondo.

Wie allbekannt, sind bei der menschlichen Tuberkulose manchmal die bovinen Tuberkelbazillen nachgewiesen worden. Möllers' Untersuchungsmaterial bestand aus nicht weniger als 2562 Fällen (Tabelle I).

Eigene Versuche.

Material. Die sämtlichen Materialien wurden Kranken der Universitätsklinik aseptisch entnommen.

Untersuchungsmethoden. Als Vorversuche verglichen wir zunächst die mit der Schwefelsäure- und die mit der Natronlaugevorbehandlung gewonnenen Resultate miteinander. Dabei fand sich, daß als Vorbehandlungsmittel die 4proz. Natronlauge vor der 5proz. Schwefelsäure den Vorzug verdient. Deshalb wurden die Materialien im Mörser mit Seesand und 4proz. Natronlauge 30 Min. lang emulgiert, 20 Min. zentrifugiert und ohne Neutralisation in je 3—5 Röhrchen auf glyzerinfreien sowie 3 Proz. glyzerinhaltigen Loewenstein-Nährböden gezüchtet.

Obwohl sich die Reaktion der Nährböden bei der Impfung von mit Säure oder Alkali vorbehandelten Bazillen, wie Tabelle II zeigt, änderte, wurde das Wachstum der Tuberkelbazillen dadurch nicht geschädigt.

Als Nährböden wurden deshalb Loewenstein-Nährböden, und zwar mit 3 Proz. und ohne Glyzerinzusatz, verwendet.

Resultat. Von 172 Materialien fiel das Züchtungsresultat bei 160, d. h. zu 90,02 Proz., positiv aus, d. h. in 1170 der 1266 gebrauchten Röhrchen zeigte sich Wachstum der Tuberkelbazillen. In 9 Röhrchen wurde Saprophytenwachstum beobachtet.

Im allgemeinen war das Wachstum auf dem glyzerinhaltigen Nährboden schneller und üppiger als auf dem glyzerinfreien. Was jedoch den Prozentsatz der positiven Fälle bei beiden Nährböden anbetrifft, so fand sich, wie Tabelle III lehrt, fast kein Unterschied.

Bei den gewachsenen Bazillen wurde mittels der Katalase- sowie der Kochfestigkeitsprobe festgestellt, daß es sich bei den sämtlichen von uns isolierten Bazillen, mit Ausnahme eines Falls, um Tuberkelbazillen und nicht um saprophytische säurefeste Bazillen handelte.

Tabelle I.

Statistik nach Mollers. (Nach dem Stande vom 1. Januar 1927.)

Nr.	Diagnose	Gesamtzahl der untersuchten Fälle	Kinder unter 5 Jahren			Kinder von 5—16 Jahren			Erwachsene über 16 Jahre			Gesamtzahl	
			hum.	bov.	zusammen	hum.	bov.	zusammen	hum.	bov.	zusammen	hum.	bov.
1	Tuberkulose der Lungen und Bronchialdrüsen	1164	58	2	60	30	—	30	1057 (+ 2)	3 (+ 2)	1062	1157 (+ 2)	5 (+ 2) = 0,43 Proz.
2	Tuberkulose der Knochen und Gelenke	233	45 (+ 3)	32 (+ 3)	80	63	12	75	50	1	51	185 (+ 3)	45 (+ 3) = 19,6 „
3a	Generalisierte Tuberkulose	404	202 (+ 5)	23 (+ 5)	220	42	6	48	25 (+ 1)	1 (+ 1)	27	350 (+ 7)	47 (+ 7) = 11,6 „
3b	Meningitis tuberculosa	58	37	4	41	7	—	7	7	—	7	54	4 = 6,89 „
4	Tuberkulose der Hals- und Achseldrüsen	300	29	27	56	76	27	103	65	2	67	179	121 = 40,3 „
5	Tuberkulose der Abdominalorgane	188	52 (+ 1)	35 (+ 1)	88	18 (+ 1)	12 (+ 1)	31	36 (+ 3)	11 (+ 3)	50	117 (+ 5)	66 (+ 5) = 36,0 „
6	Urogenitaltuberkulose	39	—	—	—	2	—	2	36	1	37	38	1 = 2,56 „
7a	Lupus	142	5	—	5	16	15	31	45 (+ 1)	10 (+ 1)	56	108 (+ 1)	33 (+ 1) = 22,76 „
7b	Tuberculosa verrucosa cutis	25	1	—	1	1	—	1	11	12	23	13	12 = 48,0 „
8	Schleimhauttuberkulose	9	—	2	2	2	2	4	2	1	3	4	5 = 55,5 „
	Zusammen:	2562	429 (+ 9)	125 (+ 9) 22,5 Proz.	563	257 (+ 1)	74 (+ 1) 22,3 Proz.	3 2	1334 (+ 7)	42 (+ 7) 3,05 Proz.	1383	2205 (+ 18)	339 (+ 18) = 13,3 Proz.

Tabelle II.
Einfluß der Vorbehandlung auf die Reaktion des Lowensteinschen Nahrbodens.

	Vorbehandlung mit 5proz. H_2SO_4	Vorbehandlung mit 4proz $NaOH$	Kontrolle
Nahrboden mit 3 Proz. Glyzerin	6,60	6,70	6,65
Glyzerinfreier Nahrboden	6,55	6,70	6,70

Tabelle III.
Resultat der Zuchtungen.

	Glyzerinhaltige Nahrboden	Glyzerinfreie Nahrboden
Zahl der positiven Nahrboden .	588 (von 633)	582 (von 633)
Prozentsatz	92,89	91,94

Typenbestimmung. Die Bazillen wuchsen auf dem Nährboden eugonisch, was das Vorhandensein des bovinen Typus nur wenig wahrscheinlich macht. Die Tierversuche wurden ökonomiehalber wie folgt durchgefuhrt: Von jedem der sämtlichen 160 Bazillenstämme wurden $^1/_{100}$ sowie $^1/_{10}$ mg Bazillen genommen. Je 10 gleiche Mengen von beliebigen Stämmen wurden zu einer 10mal so großen Menge vereinigt. So entstanden 2 Gruppen, von denen die eine nur Gemische von $^1/_{10}$ mg und die andere solche von 1 mg Bakterien enthielt. Ein solches Gemisch wurde immer 2 Kaninchen subkutan injiziert. Es fanden so im ganzen 64 Kaninchen Verwendung. Die Tiere waren ungefähr 2 kg schwer. Alle 10 Tage wurden sie gewogen, und weiter wurde dauernd die Injektionsstelle beobachtet. Die Tiere wurden nach 2 Monaten getötet und auf Veränderungen der Organe hin untersucht. Fanden sich keine oder leichtgradige Veränderungen nur an der Lunge, so galt der Bazillentypus des betreffenden Gemisches fur den humanen. Wurden dagegen auffallende Veränderungen an der Lunge, hochgradige Lymphdrüsenanschwellung und dazu Veränderungen an anderen Organen festgestellt, so wurde angenommen, daß es sich neben den Bazillen vom humanen Typus um solche vom bovinen handelte, was vorher mit bekannten humanen und bovinen Bazillen festgestellt worden war. In diesem Falle wurde die Typenbestimmung von neuem ausgefuhrt, aber so, daß jetzt nicht mehr das betreffende Gemisch, sondern von jedem der dieses zusammensetzenden Stämme ein $^1/_{10}$ bzw. 1 mg injiziert wurde.

Bei unseren Versuchen bildeten sich gewohnlich an der Injektionsstelle erbsen- bis walnußgroße Abszeßherde, welche sich bald abkapselten oder aufbrachen. Heilungstendenz war stets vorhanden. Bei manchen Fällen nahm das Korpergewicht vorubergehend ab, doch darauf stets wieder zu.

Von den gebrauchten 64 Kaninchen lebten alle, mit Ausnahme von 3 an interkurrenten Krankheiten gestorbenen, 2 Monate lang. Bei 35 fanden sich nur an der Lunge einige Tuberkel, doch keine Lymphdrüsenanschwellung und Veränderungen an anderen Organen und bei den übrigen keine Tuberkel an der Lunge, d. h. wir fanden bei unseren Kaninchen in keinem Falle eine generalisierte Tuberkulose, so daß wir das Vorhandensein von Bazillen vom bovinen Typus ausschließen konnten.

Das untersuchte Menschenmaterial ist in Tabelle IV den Krankheitsformen und dem Alter der Kranken nach wiedergegeben.

Tabelle IV.
Untersuchte Materialien nach Krankheitsformen und Alter geordnet.

Klinische Diagnose	unter 5 Jahren		von 5—15 Jahren		uber 15 Jahre		Insgesamt	
	gesamt	davon positiv	gesamt	davon positiv	gesamt	davon positiv	gesamt	davon positiv
Tuberkulose der Lunge und Pleura	—	—	1	1	76	75	77	76
Tuberkulose der Knochen und Gelenke	1	1	1	1	11	6	13	8
Meningitis tuberculosa . .	4	3	4	4	5	5	13	12
Tuberkulose der Halsdrüsen	—	—	1	1	5	5	6	6
Urogenitaltuberkulose . . .	—	—	1	1	62	57	63	58
Zusammen:	5	4	8	8	159	148	172	160

Vorkommen des bovinen Typus in Japan.

Kitasato war der erste, welcher sich in Japan mit der Typenfrage der Tuberkelbazillen beschäftigte. Er fand im Sputum von 152 Phthisikern keinen Bazillus vom bovinen Typus. Lange danach isolierten Watanabe, Kasuga und Kunida (1923) aus ihrem Material von Skrophuloderma Tuberkelbazillen vom bovinen Typus. Noch später wurde der bovine Typus von Matsuzawa (1931), Yuge (1932), Katakura (1934), Sato (1935) und Yamasaki (1938) ganz vereinzelt bei Halsdrüsen-, Urogenital- und Hauttuberkulose festgestellt. Dagegen suchten viele andere Autoren nach dem bovinen Typus bei Lungen-, Haut- sowie Halsdrüsentuberkulose, ohne ihn jedoch anzutreffen. In Tabelle V und VI sind die Resultate der bis jetzt in Japan ausgeführten Typenuntersuchungen der Tuberkelbazillen (einschließlich der unseren) wiedergegeben.

Daraus geht beim Vergleich mit Tabelle I hervor, daß bei den Japanern der bovine Typus der Tuberkelbazillen viel seltener als bei den Europäern

Tabelle V.
Von verschiedenen japanischen Autoren an Japanern festgestellte bovine Stämme in ihrem prozentualen Verhältnisse zur Gesamtzahl der positiven Fälle bei den einzelnen Krankheitsformen. (Nach dem Stande vom 1. Februar 1939.)

Nr.	Klinische Diagnose	Gesamtzahl der positiven Fälle	Humane Stämme	Bovine Stämme
1	Tuberkulose der Lungen und Pleura	875	874	1 = 0,11 Proz.
2	Tuberkulose der Knochen und Gelenke	92	90	2 = 2,17 „
3	Meningitis tuberculosa . . .	39	39	—
4	Tuberkulose der Halsdrüsen	50	48	2 = 4,00 „
5	Tuberkulose der Abdominalorgane	21	21	—
6	Urogenitaltuberkulose . . .	192	191	1 = 0,52 „
7	Hauttuberkulose	54	47	7 = 12,96 „
a	Lupus	21	20	1 = 4,76 „
b	Tuberculosis cutis verrucosa	16	12	4 = 25.00 „
c	Scrophuloderma	10	8	2 = 20,00 „
d	andere Hauttuberkulose . .	7	7	—
	Zusammen:	1323	1310	13 = 0,98 Proz.

Tabelle VI.
Von japanischen Autoren an japanischen Patienten festgestellte humane und bovine Stämme, die Patienten nach dem Alter geordnet.

Nr.	Klinische Diagnose	Kinder unter 5 Jahren			Kinder von 5—15 Jahren			Erwachsene über 15 Jahre			Gesamtzahl		
		hum.	bov.	zus.	hum.	bov.	zus.	hum.	bov.	zus.	hum.	bov.	zus.
1	Tuberkulose der Lungen und Pleura	—	—	—	1	—	1	257	—	257	258	—	258
2	Tukerkulose der Knochen und Gelenke	7	—	7	15	1	16	65	1	66	87	2	89
3	Meningitis tuberculosa	3	—	3	5	—	5	7	—	7	15	—	15
4	Tuberkulose der Halsdrüsen	4	—	4	10	1	11	33	1	34	47	2	49
5	Tuberkulose der Abdominalorgane	1	—	1	—	—	—	2	—	2	3	—	3
6	Urogenitaltuberkulose	1	—	1	10	—	10	177	1	178	188	1	189
7	Hauttubeikulose	—	—	—	8	—	8	39	—	46	47	7	54
	Zusammen:	16	—	16	49	2	51	580	10	590	645	12	657

vorkommt. Ob das damit zusammenhängt, daß die Japaner nicht viel Milch, besonders keine rohe zu genießen pflegen, oder ob dabei noch andere Ursachen eine Rolle spielen, läßt sich nur durch weitere Untersuchungen feststellen.

Zusammenfassung.

1) Wir haben aus tuberkulösen Materialien von Japanern 160 Tuberkelbazillen-Stämme isoliert und darunter keinen einzigen vom bovinen Typus angetroffen.

2) Bei den bis jetzt in Japan ausgeführten Untersuchungen hinsichtlich der Tuberkelbazillentypen bei Tuberkulosen sind unter 1323 Fällen nur 13 boviner Infektion, d. h. 0,98 Proz. aller 1323 tuberkulösen Infektionen, gefunden worden.

Schrifttum.

Möllers, Kolle-Kraus-Uhlenhuths Handb. d. pathog. Mikroorg. **5**, 694 (1928). — Kitasato, Z. Hyg. **63**, 517 (1909). — Watanabe, Kasuga u. Kunida, Jap. J. of Dermat. **23** (1923).

[Aus dem Pathologisch-bakteriologischen Institut der Wiener allgemeinen Poliklinik (Vorstand: Prof. Dr. Adolf Feller).]

Acidobacterium Moroi als Erreger eitriger Hirnhautentzündung.

Von Dr. **Alexandra Kuchinka,**

Assistent des Institutes.

Mit 3 Abbildungen im Text.

Im nachfolgenden seien zwei bemerkenswerte Fälle von eitriger Hirnhautentzündung mitgeteilt, bei welchen je ein und derselbe, der Familie der sog. „azidophilen", besser „azidotoleranten" Bakterien oder auch „Azidobakterien" zugehöriger Keim als Krankheitserreger festgestellt wurde.

Auszugsweise Wiedergabe der Krankengeschichten[1]):

Fall 1: O. R., 38jähriger Beamter, nach vorangegangener Abgeschlagenheit am 3. 9. 1938 mit Kopfschmerzen und Müdigkeit erkrankt. Unter langsamer Zunahme der Kopfschmerzen Nackensteifigkeit und Fieber. Am 7. 9. Einlieferung des bereits vollkommen bewußtlosen Patienten in das Krankenhaus der Wiener Kaufmannschaft (II. med. Abt., Leiter: Prim. Hogler); daselbst Temperatur 40°, typisches Bild einer Hirnhautentzündung und Bindehautkatarrh, sonst kein somatischer Befund. Liquor cerebrospinalis bei Lumbalpunktion unter vermindertem Druck abfließend, ziemlich stark getrübt, setzt nach einiger Zeit ein zartes Fibringerinnsel ab. Zwei Tage nach der Aufnahme (9. 9. 1938) vorübergehendes Schwinden der Bewußtlosigkeit mit geringer Ansprechbarkeit (vermutlich im Anschluß an wiederholte Lumbalpunktionen), trotzdem in der Nacht des gleichen Tages unter Auftreten von Lungenödem Exitus.

Fall 2: I. H., 31jährige Kontoristin, leidet seit 2 Jahren an Katarrhen der Nase und Stirnhöhlen mit dickflüssigem eitrigem Ausfluß aus der ersteren; zeitweise mit adrenalinhaltigen Präparaten behandelt. Am 6. 9. 1938 plötzliche Erkrankung mit Auftreten von ständig zunehmenden Kopf- und Kreuzschmerzen sowie galligem Erbrechen. Trotz Bettruhe unverminderte Schmerzen mit allmählich hinzutretender Unruhe und Verwirrtheit, auf symptomatische Behandlung keine Besserung. 9. 9. Spitalsaufnahme (S. C. Childs-Spital, Wien, Int. Abt., Leiter: Prim. Teppisch). Untersuchung daselbst ergibt Hirnhautentzündung, Temperatur 38,6—40,4°. Bei Lumbalpunktion entleert sich unter erhöhtem Druck trüber Liquor. Rhinologischer Befund (auszugsweise): Mäßige Atrophie der Nasenschleimhaut beiderseits, rechts mehr als links, mit Krusten und eingetrocknetem Sekret (alter chronischer Prozeß); keine Anzeichen einer Nebenhöhlenentzündung oder Ohrenerkrankung. Röntgenologisch am Schädel keine Abweichungen von der Norm. 5 Tage nach Beginn der Erkrankung (11. 9. 1938) Exitus letalis.

1) Für die Ueberlassung der Krankengeschichten sind wir den genannten Abteilungsvorständen zu Dank verpflichtet.

Chemische bzw. serologische Untersuchung der Rückenmarksflüssigkeit beider Fälle (ebenfalls den Angaben der Krankengeschichten entnommen):

Fall 1:		Fall 2:	
Zucker	23 mg%	WaR.	negativ
Kalzium	5,75 mg%	Pandy	+++
Magnesium	1,44 mg%	Nonne-Appelt	+
Cholesterin	negativ	Zellen	947/3
Chlor	337,0 mg%	Brandberg	0,66 ‰
		Zucker	31 mg%

Die Leichenöffnung beider Fälle — übrigens kräftig entwickelter, gut genährter Individuen — ergab eine diffuse eitrige Entzündung der weichen Hirnhäute mit gleichmäßigem Betroffensein der Basis und der Konvexität des Gehirns; der Eiter dickflüssig, graugelblich,



Abb. 1. Histologisches Präparat der Meningitis von Fall 1. Zeiss Obj. A, Ok. Kl. 2.

nicht fadenziehend. Im ersten Falle die Nebenhöhlen unverändert, im zweiten Falle deren Besichtigung vom Obduzenten unterlassen (vermutlich mit Rücksicht auf den normalen rhinologischen und röntgenologischen Befund ohne besondere Bedeutung). Sonst in beiden Fällen außer parenchymatöser Degeneration der Organe und leichter Auflockerung der Milz keine nennenswerten Organbefunde.

Histologisch das typische Bild einer unspezifischen akuten eitrigen Hirnhautentzündung mit zahlreichen polymorph- und auch einkernigen Leukozyten (Abb. 1).

Die bakteriologische Untersuchung des Meningitiseiters ergab in beiden Fällen den gleichen Befund wie die des während der Erkrankung mehrmals eingesandten Lumbalpunktats:

Milchig trüber, farbloser bis leicht gelblicher Liquor mit zartem Fibringerinnsel. Im Abstrich poly- und mononukleäre Eiterzellen und wenig zahlreiche, schlanke, ca. 7 μ lange, zum Teil intrazellulär gelagerte, grampositive Stäbchen vom Typus der Azidobakterien; bei Untersuchung zahlreicher Abstriche im allgemeinen nicht mehr als ein Keim in einigen Gesichtsfeldern,

besonders zahlreiche Keime nur ganz ausnahmsweise (Abb. 2). Ziehl-Neelson negativ, Polkörperchen nicht nachweisbar. Schon nach 12stünd. Bebrütung



Abb. 2. Natives Ausstrichpräparat des Liquorsedimentes von Fall 2 (Methylenblaufärbung). Zeiss Homog. Imm. 1/12.



Abb. 3. Nach Gram gefärbter Ausstrich einer 24 Std. alten Kultur in Leber-Leberbouillon. Zeiss Homog. Imm. 1/12.

unter aeroben, schlechter unter anaeroben Verhältnissen in flüssigen Nährmedien Wachstum mit diffuser Trübung, später unter Bildung eines wolkigen Bodensatzes (Abb. 3), auf festen Blutnährböden und besonders gut auf Traubenzuckeragar Wachstum zarter, stecknadelspitzgroßer, scharf abgegrenzter Kolonien, welche sich nach 24 Std. und später als kalottenartig prominierende, durchsichtige und scharf rundlich begrenzte Kolonien erweisen und auch nach wochenlangem Bestehen ihre Form nicht verändern. Die Keime sind unbeweglich, bilden weder Kapseln noch Sporen, ihre Gestalt auch nach wiederholten Passagen ziemlich unverändert. Ihre biochemischen Leistungen und ihr Verhalten gegenüber den üblichen differentialdiagnostisch verwendeten Nährböden, die sich während einer mehrmonatigen Beobachtungsdauer als konstant erwiesen, stellen sich folgendermaßen dar:

Lackmusmolke	rot (gesäuert)	Inosit	negativ
Dextrose	keine Gasbildung	Milch	nicht geronnen
Saccharose	negativ	Lackmusmilch . . .	rotlich, nicht geronnen
Schwefelwasserstoffbildung .	negativ	Aeskulin	gespalten
Mannit	negativ	Hämolyse	negativ
Indol	negativ	Gelatine	Wachstum

Vergleicht man unsere Stämme nach einer von Schlirf aufgestellten Tabelle[1]) mit den übrigen Typen der Azidobakterien, so zeigt sich eine weitgehende Aehnlichkeit mit dem von dem genannten Autor als „Acidobacterium Moroi" bezeichneten Typus.

Acidobacterium	Dicke in μ	Gas aus Dextrose	wachst auf Gelatine	Lackmusmilch		Säurewerte				Ansiedlungen auf Zuckeragar
				Farbe	Gerinnung	Milch	Le-Lebo	Fleischbrühe + 1 Proz. Traubenzucker	Fleischbrühe + 1 Proz. Milchzucker	
lactis	0,7	—	+	weiß, dann rot	2. Tag	13,8	10,0	7,2	6,3	granuliert
aërogenes . .	0,7	+	±	blau	—	3,6	8,6	3,0	2,4	granuliert
Moroi . . .	0,7	—	+	rotlich	—	6,4	12,0	4,0	1,5	glattrandig
Doederleinii .	1,2	(∓)	—	blau	—	2,9	8,3	6,9	3,8	lockig-zerfasert
bulgaricum .	1,2	—	—	rot	2. Tag	21,0	12,7	3,2	5,0	lockig-zerfasert
eigener Stamm (Mittelwerte beider Stämme)	0,7	—	+	rotlich	—	7,9	8,5	7,1	1,0	glattrandig

Der Vergleich unserer Untersuchungsergebnisse mit denen des Typus „Moroi" Schlirfs zeigt also mit Ausnahme der Säurewerte aus der Leber-Leberbouillonkultur auffällige Uebereinstimmung. Da diese Säurewerte bei den von uns untersuchten Stämmen bei wiederholter Prüfung fast gänzlich konstant waren und nur in den Zehntelstellen der Zahlen geringfügige Unterschiede zeigten, könnte vielleicht die Differenz gegenüber den von Schlirf erhobenen Säurewerten auf seine nicht ganz genaue Zeitangabe („etwa 6tägig") zurückzuführen sein.

Auch gehört unser Stamm in die Gruppe der nach Schlirf auf Agar „geschlossenere, granulierte bis glatte Formen" bildenden Stämme, „die kürzere und schlankere Stäbchen zeigen", welchen der Forscher eine zweite

1) Nach Schlirf sind die Säurewerte nach etwa 6tägiger Bebrütung mit n/10 NaOH-Lösung für 10 ccm Kultur bis zum Phenolphthaleinpunkt bestimmt. Genauere Angaben siehe dort.

Gruppe der „lockig zerfaserten Formen mit langen und dicken Stäbchen" gegenübergestellt.

Das Pathogenwerden von azidotoleranten Bakterien gehört, nach dem überblickten Schrifttum zu schließen, zu den allergrößten Seltenheiten. Sie werden z. B. als Erreger von Urozystitiden erwähnt (Rother), oder bei Pulpitis aufgefunden (Heim); ein schweres, zum Tode führendes Krankheitsbild beschreibt bloß Marschall in einem Falle von klinischer Endocarditis lenta, der allerdings erst kurz vor dem Tode zur Untersuchung gelangte. Es handelte sich in seinem Falle um einen Keim des Typus „Acidobacterium Döderleinii".

Als Infektionsweg wäre in unseren Fällen — in weitgehender Analogie mit der bekannten sog. „idiopathischen" Pneumokokkenmeningitis — eine Aszendenz vom Nasen-Rachenraum bzw. den zugehörigen Nebenhöhlen anzunehmen, um so mehr als auch Azidobakterien gelegentlich als harmlose Bewohner derselben anzutreffen sind. Auch die anamnestisch bemerkenswerte Tatsache einer schweren chronischen Rhinitis und Entzündung der Stirnhöhle in unserem zweiten Falle stützt die Annahme des von uns vermuteten Infektionsweges.

Zusammenfassung.

In zwei Fällen von diffuser eitriger Hirnhautentzündung, die im Verlaufe von 6 bzw. 5 Tagen bei zwei jüngeren und kräftigen Personen zum Tode führte, wurde ein den Azidobakterien, und zwar dem Typus Moroi (Schlirf) zugehöriger Stamm sowohl mehrmals vom Liquor cerebrospinalis während der Erkrankung als auch aus dem Meningitiseiter des Leichenorganes gezüchtet. Der beschriebene Stamm wird als Erreger der Erkrankung angesprochen und Aszendenz vom Nasenrachenraum oder dessen Nebenhöhlen als wahrscheinlicher Infektionsweg angenommen.

Schrifttum.

Schlirf, Karl, Zbl. Bakter. I Orig. **97**, 104 (1926), — Marschall, Fred, Zbl. Bakter. I Orig. **141**, 153 (1938). — Weitere Literaturangaben siehe ebendort.

[Aus dem Institut für Lebensmittelhygiene an der Universität Berlin (Direktor: Prof. Dr. M. Lerche).]

Die Bedeutung des Antigens für die Agglutinationsreaktion und das „absolute Verfahren“ der Agglutinationsprobe[1]).

Von Erich Vellisto,
Tierarzt aus Vana-Vändra (Estland).

Die Aufgabe der folgenden Arbeit ist es 1. die Bedeutung des Antigens für die Agglutinationsreaktion zu erforschen und 2. ein Verfahren der Agglutinationsreaktion auszuarbeiten, das konstante Resultate zu erhalten ermöglicht.

A. Schrifttum.

Die Dichte des Antigens ist ein Faktor, der den Agglutinationswert beeinflussen kann. Wir konnen in der Literatur verschiedene Ansichten hinsichtlich der Dichte des Antigens finden.

In vielen Abhandlungen, in welchen die Agglutinationsreaktion behandelt wird, werden keine Angaben über die Dichte des Antigens gemacht. Diesen Umstand konnte man entweder durch die Meinung erklaren, daß die Dichte des Antigens unwesentlich für die Agglutinationsreaktion sei, oder daß die Dichte des Antigens allen bekannt sein müßte.

Ferner findet man in der Literatur Angaben über die Dichte des Antigens, nach denen man ihr jedoch keine ausschlaggebende Bedeutung bei der Reaktion zuzumessen braucht. So z. B. berichten Laun und Heide (33), daß 2 Tier- und 2 Menschen-Bang-Stämme mit spezifischem Kaninchenserum geprüft wurden, wobei dichtes Antigen deutlichere Agglutination zeigte als dunneres. Meyn (40) glaubt nicht, daß ein dichteres oder dünneres Antigen (Pullorum, Schnellagglutination) Einfluß auf das Ergebnis haben konnte. T. Messerschmidt (39) schreibt: „Differenzen in den Resultaten habe ich nie gesehen, wenn man mit dichten oder stark verdünnten Suspensionen in Parallelversuchen arbeitet.“ Poppe (46) meint: „Die Dichte der Aufschwemmung ist insofern von Bedeutung, als weniger dichte, d. h. weniger Bakterien enthaltende Aufschwemmungen besser zu beurteilende Ergebnisse liefern (Mathews).“

Meist wird in den Abhandlungen oder betreffenden Handbüchern eine konstante Dichte des Antigens angewendet. Letztere ist jedoch bei den einzelnen Autoren und in den einzelnen Instituten verschieden: z. B. empfehlen das Reichsgesundheitsblatt (50), Stableforth (56) u. a. ein Antigen, dessen Opaleszenz einer $BaSO_4$-Aufschwemmung entspricht, die mit 97 ccm 1 Proz. H_2SO_4 und 3 ccm $BaCl_2$ hergestellt ist. Klimmer (25, 26) und M. Schwartz (36) benutzen einen Test, durch dessen 4 cm hohe Schicht eine gewohnliche Druckschrift entzifferbar ist. Kristensen (30) liest Druckschrift durch eine Testsäule von 2 cm Durchmesser, Schumann (53) durch ein gefulltes Reagenzglas. Nach S. Wall enthält das Antigen 0,1 Vol.Proz. Bakterienmasse, nach Diernhofer (8) 0,03 Proz. Bakteriensediment. Uwarow benutzt ein Antigen mit 500 Millionen Keimen in 1 ccm Testflüssigkeit.

---

1) Erschienen als Dissertation der Veterinärmedizinischen Fakultät der Friedrich-Wilhelms-Universität in Berlin.

Zur Einstellung der Dichte des Antigens werden außerdem noch Nephelometer, Opacimeter und andere Instrumente angewendet. Von vielen Autoren wird der Antigendichte größere oder geringere Bedeutung bei der Agglutinationsreaktion zugemessen. Gruber (zit. nach 5) meint: wichtig ist die Zahl der Bakterien im Verhältnis zur Serummenge; Winterberg, Landsteiner u. Tobiesen (zit. nach Eisenberg u. Volk) meinen, daß der Titer von der Dichte des Antigens abhangig ist, er ist desto höher je dünner das Antigen ist. Eisenberg u. Volk (5) dagegen haben gefunden, daß einer großen Vermehrung der Bakterienmenge nur eine geringe Steigerung der Absorption von Agglutininen entspricht. Diernhofer (8) teilt mit, daß die Agglutininmenge, welche mit einem Bang-Antigen eine Agglutination von bestimmter Intensität geben soll, mit der Bakterienzahl des Antigens innerhalb eines weiten Konzentrationsbereiches annähernd proportional ist. Kristensen u. Holm (32) berichten, daß sie bei der Bang-Diagnose dichte Aufschwemmungen angewendet haben, um schnellere Resultate zu erhalten und sie besser ablesen zu konnen; dünnere Antigene geben höhere Titer. Pollaci (45) meint, daß der Titer von der Dichte des Antigens abhängig ist. Stableforth (56, 57), ebenso Frei (12) u. Willems (72) fordern, daß die Agglutinationsfähigkeit des Antigens mit einem Standard-Trockenserum ausgewertet werde. Stableforths Versuche zeigen eine Abhängigkeit des Agglutinationswertes von der Opaleszenz des Antigens innerhalb gewisser Dichtegrenzen des letzteren.

Stockmayer (59) hält das Antigen, besonders seine Dichte, für sehr wichtig für die Agglutinationsreaktion. Topley u. Wilson (62) schreiben: kleinere Variationen in der Dichte des Antigens bedingen verhältnismäßig kleine Abweichungen des Titers, wenn ein gegebenes Serum mit gegebenem Antigen ausgewertet wird. Nach Willems (72) soll die Dichte des Antigens möglichst gleich der Grundemulsion sein. Joos (22) hat durch Versuche folgende Gesetze ermittelt: 1. Für eine bestimmte Menge agglutinierbarer Substanz ist eine bestimmte Menge von Serum und eine bestimmte Menge von Salz zur vollständigen Agglutination nötig. 2. 1 Mol. Antigen kann sich mit verschiedenen Mengen Agglutinin verbinden, um verschiedene Zusammensetzungen zu liefern. Fitch u. Thompson (11) teilen mit: Prüfung von 13 verschiedenen Brucella-Antigenen zeigen erhebliche Unterschiede. Schumann (53) schlägt vor, man solle einem bestimmten Institut überlassen, Standardserum zu liefern, um die Kontrolle des Antigens zu ermöglichen.

Bakterienstämme des Antigens. Auch hinsichtlich dieser Frage sind in der Literatur verschiedene Meinungen vertreten. Meist werden in wissenschaftlichen Abhandlungen keine Angaben über die Zahl und Eigenschaften der Stämme des Antigens gemacht. Man kann in der Literatur aber auch Mitteilungen darüber finden, daß die Stämme keine große Bedeutung in der Agglutinationsreaktion zu haben brauchen, z. B. schreibt Poppe (46): hinsichtlich der Agglutinabilität der einzelnen Brucella-Stämme scheinen keine Unterschiede zu sein. Ein Antigen aus einem Bang-Stamm verwenden z. B. Kristensen u. Holm. Viele Autoren verwenden aber mehrere Stämme für die Bereitung des Antigens: Klimmer (26), Laun u. Heide (33), Lentz (36), Mießner u. Schütt (41), M. Schwarz (55) u. a. Mehrere gut agglutinable Stämme verlangen zur Antigenbereitung: Diernhofer (7), Lerche (36), Reichsgesundheitsblatt (50), Schumann (53), Willems (72), M. Winkler (73). Reichsgesundheitsblatt (50), Willems (72), Witte (74) u. a. verlangen außerdem, daß die Stämme keine Spontanagglutination zeigen dürfen. Frei (12) fordert, daß die Mischung von verschiedenen gut agglutinablen Stämmen international vorgeschrieben wird. In vielen Arbeiten ist die Ansicht vertreten, daß nicht alle Bakterienstämme gleichwertig sind. So empfehlen z. B. L. Heim (17), Hutyra u. Marek (21), mehrere Stämme bei der Antigenbereitung anzuwenden; Kamada (23) teilt mit, daß es leicht gelingt, die Stämme von Br. abortus derart zu verändern, daß kulturell, mikroskopisch und serologisch abweichende Stämme erhalten werden. Kraus, Kovács, Paltauf (29) berichten über inagglutinable Stämme, über Spontanagglutination der Bakterien und Hydrolyse der Nukleoproteide, welche Umstände alle den Agglutinationswert beeinflussen können. Sie teilen mit, daß frisch isolierte Stämme oft verminderte Agglutinabilität besitzen. Letzteres behaupten ebenfalls Porges u. Prantschoff (47), und außerdem meinen sie, daß bei Antigen aus einer normalen nicht erhitzten Kultur der Titer großen Schwankungen unterworfen ist; dagegen sollen die Antigene aus Kulturen, die bei 100° C eine Stunde erhitzt sind, konstante Werte geben. Nach Pollaci (45) sind alle Stämme agglutinabel mit geringen Varianten der Titer; aus Blut entnommene homologe Stämme sollen höhere Titer zeigen. Walker (69) hat durch wiederholte Fortzüchtung im spez. agglutinierenden Serum, das mit Bouillon verdünnt war, viele disagglutinable Formen („Phasen") von vielen meist der Paratyphusgruppe zugehörigen Stämmen erhalten, welche mit einem positiven Serum negative Agglutination geben können. Mießner (42) meint, daß die Agglutinationsresultate abhängig seien von der Dichte und den Stämmen des Antigens, weshalb er vorschlägt, Antigen aus einer Zentralstelle zu versenden. Traum u. Henry (63) meinen: das Antigen kann maximal bis 25 Proz. aus rauhen Kolonien bereitet werden.

Bereitung des Antigens. Zur Züchtung der Antigenbakterien werden meist feste Nährböden angewendet. Gewöhnlicher Agar wird von Eisenberg (4), Mießner u.

Schütt (41), Kristensen (30), Hutyra u. Marek (21), Pollaci (45), Messerschmidt (39), Reinhardt u. Gauß (51) u. a. angewendet. Glyzerinagar haben benutzt Reeser (49), Laun und Heide (33), Leberagar: Uwarow (64), Zuckeragar: Diernhofer (7), Kristensen und Holm (32) usw. Serumagar hat Hendricsson (18) angewendet; 2 Proz. Glyzerin + 1 Proz. Glukoseagar: Traum und Henry (63), Serumbouillon: S. Wall (70) und Gelatine: Willems (72).

Es werden meist 2—3—4tägige Bang-Kulturen zur Aufschwemmung benutzt, wenn der Bakterienrasen genügend stark gewesen ist. Eisler und Silberstein (6) haben gefunden, daß die Typhusbakterien, die auf feuchtem Agar gezüchtet sind, bessere Agglutination zeigen und weniger stabile Suspension bilden, als die auf älterem trockenen Agar gewachsenen. 0,5 Proz. Phenol soll fällungshemmend wirken, ebenso 2 Std. dauerndes Schütteln.

Lebende und getötete Bakterienaufschwemmungen. Es werden zur Agglutinationsreaktion lebende und getötete Bakterienaufschwemmungen verwendet. Die letzteren sind nicht gefährlich für den Arbeiter und sind beliebter. Es gibt Anhänger von lebenden und getöteten Kulturen: L. Heim (17) sagt: abgetötete Kulturen sind den lebenden nicht ganz gleichwertig, sie können eine geringere oder stärkere Reaktion geben. Mießner und Schütt (41) meinen: abgetötete Bakterien eignen sich nicht zur Herstellung von Test, weil nach ihren Versuchen durch letztere Fehler entstehen können. Th. Messerschmidt (39) sagt ebenfalls: abgetötete Kokken (Maltafieber) sind weniger geeignet als lebende. Abgetötet werden die Bakterien auf verschiedene Weise: entweder z. B. 5 Min. in strömendem Wasserdampf (Hutyra und Marek), oder 1 Std. bei 60° C, oder 1—2 Std. bei 60° (Klimmer, 25), oder nach Kristensen und Holm (32) — einige Tage bei Zimmertemperatur mit Formalinwasser stehen lassen. Nach Frei (12) ist eine Erhitzung nicht angezeigt.

Konservierte Antigene sind meist mit 0,5proz. Phenolkochsalzlösung hergestellt [Diernhofer (7), Hutyra und Marek (21), Klimmer (26), Lerche (36), Porges und Prantschoff (47), Quinlan (48), Reeser (49), Reichsgesundheitsblatt (50), Schumann (53), Schwarz (55), Traum und Henry (63), Uwarow (64), Winkler (73) u. a.] Poppe sagt (nach Huddleson): das Konservierungsmittel hat keinen Einfluß auf die Agglutinabilität des Antigens.

Auch Formalin wird als Konservierungsmittel angewandt, z. B. 0,1 Proz. von Mießner u. Schütt; 0,2 Proz. von Kristensen u. Holm (32), Laun u. Heide (33); 0,4 Proz. von Hendricsson (18); 0,5 Proz. von Konrich (28). Frei (12) empfiehlt dazu noch 0,2proz. Trikresollösung; Mießner u. Schütt (41) haben auch 1 Proz. Yatren und 0,5 Proz. Chinosol angewendet.

Die zubereitete Bakterienaufschwemmung wird von den meisten Autoren durch Papierfilter filtriert. Nach der Standardisierung wird das Antigen im Eisschrank (Kristensen), nach Willems ohne Licht bei 5—10° C aufbewahrt.

Alter des Antigens. Man kann das Antigen nach Reichsgesundheitsblatt (50) bis 3 Monate, nach Willems (72) mindestens 3 Monate zur Agglutinationsreaktion anwenden. Nach Stableforth ist die Agglutinationsfähigkeit des Testes 3 Monate und länger konstant. Nach Donham u. Fitch (10) ist das Antigen bestenfalls bis 6 Monate anwendbar. Kristensen u. Holm (32) meinen, daß in 6 Monaten, und Laun u. Heide (33), daß in 12 Monaten keine Veränderung seiner Eigenschaften eintritt. Nach Gutfeld (15) erhält man bis $2^1/_2$ Jahre dauernde Haltbarkeit des Antigens durch Trocknung. Traum u. Henry (63) berichten, daß alte, vor Jahren hergestellte Antigene nicht so schnell agglutinieren, wie frisch isolierte Kulturen, doch geben erstere höhere Titer. Frei (12) meint, daß das Alter der Bang-Aufschwemmungen keinen großen Einfluß auf die Agglutinationsfähigkeit ausübt.

Technik der Agglutinationsprobe. Die Bereitung der Antigen-Serumverdünnung erfolgt entweder durch Zufügen in kleinen Mengen von dichtem Antigen zur Serumverdünnung (Reichsgesundheitsblatt u. a.), oder durch Zufügen in kleinen Mengen von Serum oder dessen Verdünnung zum verdünnten Antigen (z. B. Kristensen, Summa, Wall u. a.), oder durch Zusammenbringen von verdünntem Serum mit verdünntem Antigen (Lerche, Schumann u. a.). Zur Reaktion werden Agglutinationsgläser von verschiedener Breite angewendet (von ca. 5—10 mm und darüber).

Die angewandte Temperatur ist sehr verschieden. Nach Eisenberg und Volk (5), Hefferan (16), Wilson u. Topley (62), Vellisto (68) u. a. ist die Agglutinationsreaktion bei ca. 0° C möglich. Zimmertemperatur wird bei Fickerschem Thyphusdiagnostikum empfohlen, auch Castellani (3), Minelli (43), Summa (60) (Bang), Wyschelessky (75) (Bang) u. a. haben diese Temperatur angewandt. Meist bedient man sich bei der Agglutinationsprobe wohl der Temperatur von 37° C in kürzerer oder längerer Dauer, z. B. Joos (22) einige Stunden, Konrich (27) bei Melitensis-Infektion 1 Std., Eisenberg u. Volk (5), Heim (17), Laun u. Heide (33), Lentz (35) 2 Std. usw. Beobachtungszeit von mehreren Tagen haben z. B.: Hutyra u. Marek (21) 36 Std., Frei (12) bei Bang-Infektion 48 Std. usw. Danach müssen die Proben oft noch bei Zimmertemperatur stehen. Höhere Temperaturen wie 42° C und 50—55° C werden ebenso angewandt, besonders oft bisher bei der Typhus-Paratyphus-Diagnose. Bei der Bang-Diagnose hat z. B. Kristensen 50° C angewandt,

Gardner 55° C (nach Stableforth). Vellisto hat bei 3 Std. dauerndem Stehen der Bang-Proben im Wasserbade bei 55° C schnellere Agglutination als bei niedrigen Temperaturen erhalten.

Die Ablesung der Agglutinationsreaktion erfolgt nach verschieden langen Zeitabschnitten, angefangen mit einigen Stunden (z. B. Castellani, Heim, Laun u. Heide, Kirstein u. a.) und betragt meist 12—24 Std. Ueber 24 Std. dauernde Beobachtungszeit wird seltener angewandt: so hat Eisenberg zuweilen, wenn es notig war, die Reaktion, erst nach 48, 72 oder 96 Std. abgelesen. Hutyra u. Marek (21) lesen nach 36 Std., Klimmer (26) nach 42 Std. (Bang) ab. Frei (12) beobachtet bei Bang-Infektionen die Reaktion bis zu 48 Std., wenn fruher keine gut erkennbare Agglutination zu sehen war, Vellisto (65) bis zu 72 Std. und Wyschelessky von 48 bis 64 Std. (Bang).

Eigene Arbeiten.

Es ist wohl zweckmäßig, anfangs kurz über einige meiner Arbeiten zu berichten, die schon veröffentlicht worden sind, da sie als Einleitung zu meiner vorstehenden Arbeit dienen, und vieles aus ihnen hier Verwendung gefunden hat.

Von quantitativen Verhältnissen der Antigen-Agglutininmengen bedingte Phänomena bei der Agglutinationsprobe.

„Agglutinationsreihe“ (66). Bei einer Agglutinationsprobe sind die Gläschen mit je 1 ccm Serumverdünnung so aufgestellt, daß die Reihe links beginnt und daß jedes nach rechts folgende Gläschen 2mal mehr verdünntes Serum als das vorhergehende enthält: z. B. 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40 usw., oder 1 : 25, 1 : 50, 1 : 100 usw. Solch eine Reihe werden wir Agglutinationsreihe eines Serums nennen.

„Zonen (Abschnitte) der Agglutinationsreihe“. Wir können die Agglutinationsreihe eines positiv reagierenden Serums in drei Abschnitte oder Zonen teilen, und zwar eine „linke oder positive Zone“. Hierbei ist in den Agglutinationsgläschen überall eine positive Agglutinationsreaktion zu verzeichnen, oder es muß immer eine positive Reaktion vorausgesetzt werden. Der Bodensatz ist breit, und die Flüssigkeit über ihm ist klar. Die Agglutinationsgläschen können wir von links nach rechts Ap_1, Ap_2, Ap_3 usw. nennen. Diesem Abschnitt folgt nach rechts die Zone, in der das Agglutinationsphänomen allmählich stufenweise verschwindet: „Mittlere oder Titerzone“. In allen Gläschen ist hierbei eine partielle Agglutination zu sehen. Die Gläschen können wir At_1, At_2, At_3 usw. nennen.

Weiter nach rechts erreichen wir den Bezirk der negativen Agglutination der Reihe. Das Sediment ist knopfartig, und die darüber stehende Flüssigkeit ist trübe: „Rechte oder negative Zone“. Alle Gläschen weisen eine negative Agglutination auf. Die Gläschen kann man An_1, An_2 usw. nennen.

„Agglutinationsgefälle der Titerzone“. Wenn die Agglutininmenge in den Grenzwertgläschen (At) gleich 100 ist, so muß das nächstfolgende Gläschen rechts 50, und das zweitnächste usw. Gläschen rechts 25, 12,5, 6,25 usw. Agglutinin enthalten. Links aber vom Agglutinationsgläschen (At) muß Agglutinin in aufsteigender Menge vorhanden sein: 200, 400, 800 usw. Nach dem Hinzufügen zu einem jeden Gläschen der soeben beschriebenen Agglutinationsreihe von je 1 gtt (= 100) Antigen müssen folgende Zustände entstehen (s. Tabelle I).

Tabelle I.

Agglutinationsgläschen	At_{-2}	At_{-1}	At	At_{+1}	At_{+2}	At_{+3}	At_{+4} usw.
Agglutininmenge	400	200	100	50	25	12,5	6,25 usw.
Antigen	100	100	100	100	100	100	100
Antigen bleibt ungebunden . .	0	0	0	50	75	87,5	93,75 usw.

Im 7. Agglutinationsgläschen der Agglutinationsreihe ist noch 6,25 Agglutinin enthalten, also verhältnismäßig wenig, weshalb diese Gläschen vielleicht praktisch als agglutininfrei angesehen werden können, da wir kaum eine so kleine Menge von agglutinierten Bakterien bemerken und erfassen können. Noch weiter nach rechts beginnt eine Zone, wo Agglutinine in solchen unterschwelligen Mengen vorhanden sind, daß sie nicht imstande sind, auch nur eine partielle Agglutination der Antigenbakterien hervorzurufen. Wenn man mehrere Agglutinationsreihen ansetzt, wobei die Agglutininmengen der Verdünnungen so gewählt sind, daß in den At-Gläschen verschiedener Reihen verschieden große Mengen Agglutinin erprobt werden, so erhalten wir Agglutinationsreihen, bei welchen die Agglutininmengen in gleicher Weise nach rechts immer kleiner werden.

Wenn wir statt der Agglutininmengen die Sedimente am Boden der Gläschen der Reihe aufzeichnen, so erhalten wir bei der vollständigen Agglutination einen breiten Bodensatz 3, rechts davon bei unvollständiger Agglutination einen etwas schmaleren Bodensatz 2, noch weiter rechts einen noch schmaleren Bodensatz 1, danach rechts einen knopfartigen Bodensatz „n". Diese stufenweise Verminderung des Bodensatzes aus agglutinierten Antigenbakterien in der Titerzone bildet ein Agglutinationsgefälle. Das Agglutinationsgefälle zeigt, wie in der Titerzone die Menge der agglutinierten Antigenbakterien fortdauernd von links nach rechts abnimmt, um in der negativen Zone der Agglutinationsreihe praktisch zu verschwinden. Absolut genommen, kann die Agglutininmenge in der negativen Zone der Reihe niemals „Null" werden.

Beim Betrachten der verschiedenen Agglutinationsgefälle können wir feststellen, daß sie beim praktischen Aufzeichnen der Agglutinationsphänomena fast alle gleichen Charakter besitzen. Ein Agglutinationsgefälle können wir bei jeder Agglutinationsreihe feststellen, wenn nur die jedesmal nötigen Verdünnungen vorhanden sind. Wir können annehmen, daß das Verhältnis zwischen dem mathematisch ausgerechneten Agglutinationsgefälle und dem von uns in der Praxis beobachteten Agglutinationsgefälle ungefähr konstant bleibt, also daß wir das letztere als Ausdruck des ersteren beim Ablesen der Agglutinationsreaktion annehmen können. Oft wird in der Praxis die Agglutinationsreaktion durch zu frühzeitiges Ablesen unterbrochen — ehe das Agglutinationsgefälle sich endgültig ausgebildet hat: und so kann es teilweise oder sogar ganz fehlen, ebenfalls fehlt es bei negativ reagierenden Sera. Wenn man beim Ablesen der Agglutinationsreaktion die Agglutinationsgefälle aufzeichnet, so kann man damit das Agglutinationsresultat eingehender und genauer fixieren, als das bei der üblichen Titerbestimmung der Fall ist; wichtig ist es besonders bei wissenschaftlichen Arbeiten und bei Auswertungen der zweifelhaft reagierenden Sera.

Das Agglutinationsgefälle befindet sich bei einem bestimmten Serum immer auf derselben Stelle in der Agglutinationsreihe. Deswegen ist es möglich, das Agglutinationsgefälle zur Bestimmung des Agglutinationswertes des Serums anzuwenden. Zur Bestimmung des Agglutinationswertes können wir das letzte Gläschen mit vollständiger Agglutination (At) der Reihe wählen, wir können aber auch die nächsten Verdünnungen (At_1, At_2 usw.-Gläschen) mit verschiedenen Graden der unvollständigen Agglutination, sowie auch die erste Verdünnung rechts von der Titerzone mit negativem Agglutinationsphänomen benutzen. Letzteren Titer kann man den Titer der negativen Zone nennen. Die so auf verschiedene Weise erhaltenen Titer sind nicht gleichwertig, resp. identisch, und man kann sie nicht ohne Korrektur miteinander vergleichen.

Bei Hemmungen und Sera, welche unbestimmte Agglutinationsphänomena verursachen können, bietet der Titer der negativen Zone Anhaltspunkte für die Beurteilung der Agglutinationsreaktion. Aus dem „n"-Phänomen (knopfartiger Bodensatz) können wir feststellen, daß eine positive Reaktion sich nur links vom genannten (An-)Gläschen finden kann. Dabei kann der „positive" Titer nicht höher sein, als eine viermal niedrigere Verdünnung des An-Gläschens (z. B. wenn der Titer der negativen Zone 1:160 ist, so kann der Titer der positiven Zone bei gewöhnlicher makroskopischer Ablesung der Reaktion nur maximal 1:40 sein). Vorausgesetzt werden muß dabei nur, daß keine unspezifischen Sedimente vorliegen. Eine Agglutinationsreaktion der negativen Zone ist weniger Hemmungen unterworfen als die Agglutinationsreaktion der Titerzone oder sogar zuweilen der positiven Zone, wohl deswegen, weil das Serum mehr verdünnt und die Hemmung durch letzteres kleiner ist. Deswegen ist der Titer der negativen Zone oft sogar genauer als der übliche Agglutinationswert der positiven Zone.

Die Abhängigkeit der Höhe des Agglutinationswertes von der Dauer der Beobachtungszeit.

Das Problem der Ablesezeit ist bisher noch nicht als gelöst zu betrachten. Man hat nicht genügend versucht, die Ablesezeit als selbständige Frage aufzustellen und zu beantworten.

Die Wichtigkeit dieser Frage habe ich (67) damit zu veranschaulichen versucht, daß ich an Daten über einige Sera gezeigt habe, wie die Agglutinationswerte steigen, wenn man eine Agglutinationsreihe in gewissen Abständen mehrere Male, z. B. nach

	4	8	11	24	72	120 Stunden abliest:
1. Serum	—20;	±20;	20;	20;	40;	80;
2. „	20;	160;	640;	1280;	1280;	±2560.

Ein stetes Steigen des Titers ist deutlich zu verzeichnen. Es liegt kein Grund zur Annahme vor, daß das Steigen des Agglutinationswertes in 24 Std. beendet sein muß und dann nicht mehr fortschreiten kann. Man beobachtet oft noch nach mehreren Tagen ein Steigen des Titers. Ich habe Beobachtungen über 122 Agglutinationsreihen speziell dazu durchgeführt, um die Steigerung des Titers hauptsächlich bei Anwendung von Bang-Antigen und bei 8 Sera mit Pullorum-, bei 5 Sera mit Prodigiosus-, bei 2 Sera mit Malleus-, bei 5 Sera mit Typhus- und bei 4 Sera mit Paratyphus-B-Schottmüller-Antigen zu verfolgen. 84 Agglutinationsproben wurden mit Blutsera, 18 mit Milchsera und 20 mit Eutersekret angestellt. Bei diesen Versuchen wurde meist ein Steigen des Agglutinationswertes beobachtet. Deswegen muß mit diesem Umstand immer gerechnet werden, wenn exakte Agglutinationswerte erzielt werden sollen. Die Ablesung des Titers muß in diesem Falle dann geschehen, wenn die Reaktion endgültig abgelaufen ist. Um festzustellen, ob das letztere der Fall ist, ist es zweckmäßig, nach gewissen Zeitabschnitten die Reaktion abzulesen, wodurch man eine Dynamik des Steigens des Titers erhält. Wenn der Agglutinationswert nicht mehr steigt, so hat die Reaktion ihren Abschluß gefunden und der höchste Titer ist erreicht. Oder man muß beim Ablesen der Agglutinationsreaktion andere Methoden zur Kontrolle heranziehen.

Die zuletzt abgelesenen Agglutinationswerte sind konstant. Die früher abgelesenen Werte können aber einen relativen Charakter besitzen und stellen dabei veränderliche Größen dar. Deswegen ist es wichtig, daß beim Agglutinationswert die Ablesezeit angegeben wird, womit dem Leser Klarheit darüber gegeben ist, ob man es mit „relativen" oder „absoluten" Agglutinationswerten zu tun hat.

Man kann das Steigen des Agglutinationswertes damit erklären, daß es eine Reihenfolge der Senkung der Antigenbakterien in den Agglutinationsgläschen der verschiedenen Zonen der Agglutinationsreihe gibt.

Letztere ist meist folgende:

Auf der linken Seite der positiven Zone bildet sich das Sediment meist am schnellsten, danach der knopfartige Bodensatz der negativen Zone. Am spätesten bildet sich oft das Sediment auf der rechten Seite der positiven Zone und in der Titerzone, wo das Sediment die längste Zeit braucht, um zu Boden zu sinken.

Es scheint, daß Antigen mit wenig Agglutinin beladen sich nicht schnell zu großen Klumpen vereinigen können. Bei wenig Agglutinin sind die Agglutinine „zerstreut“ in der Flüssigkeit, und es erfordert Zeit, bis sie zum Antigenpartikelchen gelangen. Dabei ist es noch möglich, daß sich ein Hinüberwandern der Agglutinine von einem Antigenpartikelchen zum anderen vollziehen muß, um das zweite Partikelchen zu „sättigen“. Ebenso sind die gesättigten Bakterien in der Titerzone weiter voneinander gelegen, weil sie in der Flüssigkeit unter den Antigenbakterien zerstreut sind. Zur Ueberwindung der Ferne ist hier mehr Zeit erforderlich. Ebenso könnte es möglich sein, daß bei wenig Agglutinin die Antigenbakterien mit weniger Kraft zum Verklumpen versehen sind. Auch können die mit Agglutinin nicht gesättigten, suspendierten Bakterien die gesättigten Antigenbakterien bei ihrer Verklumpung mechanisch und vielleicht auch dynamisch eher hindern als fördern (indem sie als „Schutzkolloide“ wirken). Wir können eine Hemmung in der Bildung von Sediment eher in der Titerzone als in der negativen Zone der Agglutinationsreihe beobachten. Es scheint, daß die nicht gesättigten Bakterien in letzterer schneller einen deutlichen Bodensatz bilden können, als die Mischung aus mit Agglutinin gesättigten und nichtgesättigten Bakterien des Antigens in der Titerzone. Diesen Vorgang muß noch der Umstand begünstigen, daß in der negativen Zone das Serum mehr verdünnt ist als in der Titerzone.

Ueber den Einfluß der Wärme auf die Agglutinationsreaktion.

Die „bequemsten“ Temperaturen in der Laboratoriumspraxis sind wohl die von 37° C und die Zimmertemperatur, weil sie in jedem Laboratorium vorhanden sind und keine Extrakosten und Arbeit erfordern. Deswegen ist es wichtig, die Bedeutung dieser beiden Temperaturen für die Agglutinationsreaktion aufzuklären, um sie möglichst vorteilhaft ausnützen zu können. Ich wollte hauptsächlich einen Ueberblick darüber erhalten, wie der verschieden lang dauernde Aufenthalt der Agglutinationsgläschen bei Brutschrank- und Zimmertemperatur in der gewöhnlichen Laboratoriumspraxis auf die Agglutinationsreaktion einwirkt, und wie dabei — speziell bei der Brucellose — die Resultate von diesen Temperaturen abhängig sein können. Denn bei der letzteren Krankheit ist die Agglutinationstechnik weniger untersucht worden. Die Beobachtungen sind gemacht mit 23 Blut- und 8 Milchsera, zusammen mit 108 Agglutinationsreihen. Es wurde Brucella-Antigen angewendet, nur bei einem Menschenserum — Paratyphusantigen. Die Agglutinationsgläschen hatten einen Durchmesser von 7½ mm, enthielten 1 ccm Testflüssigkeit (+ 0,5 Proz. Phenol) von solcher Dichte, daß durch eine Testsäule von 2,8 cm Höhe die Druckschrift kaum lesbar war. Erhaltene Resultate:

1. Die angewandte Temperatur (Zimmertemperatur oder 1—24 Std. lang bei 37° C und danach 23—0 Std. Zimmertemperatur) hat gewöhnlich keinen Einfluß auf den endgültigen Agglutinationswert des betreffenden Serums gehabt, — vorausgesetzt eine genügend langdauernde Beobachtungszeit.

2. Das 3—24 Std. lange Stehen bei 37° C hat meist (50 Proz.) fördernd auf die Agglutinationsreaktion eingewirkt, im Vergleich mit den Agglutinationsreihen, die die ganze Zeit bei Zimmertemperatur oder nur 1 Std. bei 37° C gestanden haben. Hemmende Wirkung der 37° C (3—24 Std.) war bei 20 Proz. und keine Wirkung bei 26 Proz. zu verzeichnen.

3. Wenn die Reaktion nach 24 Std. abgelesen wird, so ist der 3—24 Std. dauernde Aufenthalt der Agglutinationsreihen bei 37° C nützlich gewesen für den Ablauf der Reaktion bei 50 Proz. der Sera, wo also höhere Agglutinationswerte erreicht wurden, dagegen war eine Verzögerung der Reaktion, also niedrigere Agglutinationswerte nur bei 3 Proz. der Sera zu verzeichnen. Bei den übrigen Sera hatte die Temperatur keinen Einfluß auf die Agglutination ausgeübt.

4. Von 22 Agglutinationsreihen mit Blutsera wurden endgültige Agglutinationswerte schneller erhalten:

a) nach kürzerem Stehen bei 37° C oder 15° C . . . . 23 Proz.
b) nach längerem Stehen bei 37° C . . . . 32 „
c) das Stehen bei 37° oder 15° C hatte keinen Einfluß . . . 45 „

Also: die Kombination c + b war für die Reaktion „vorteilhafter“ als c + a gewesen.

5. Je länger die Beobachtungszeit der Agglutinationsreaktion gedauert hat, desto geringer wird der fördernde Einfluß der Temperatur auf die Höhe des erzielten Agglutinationswertes.

6. Das Agglutinationsphänomen der negativen Zone wird durch die Temperatur von 37° C nicht gefördert, und man kann hier mit Zimmertemperatur oder kurzem Aufenthalt (1 Std.) bei 37° C oft schnellere Resultate erzielen als nach längerem Stehen bei 37° C.

Im allgemeinen kann man behaupten, daß der Temperatur in den Grenzen, in welchen sie hier angewendet wurde, kein entscheidender Einfluß auf den Agglutinationswert zugemessen werden kann. Die Anwendung von 37° C ist wichtig bei kurz dauernder Beobachtungszeit. Sie bewirkt nicht die Höhe des endgültigen Agglutinationswertes, doch fördert sie meist das Hervortreten desselben.

Theoretisch ist das annehmbar, weil es nicht möglich ist, daß die Temperatur den endgültigen Agglutinationswert beeinflussen könnte. Denn die Temperatur birgt nichts Materielles in sich, was die Agglutinine binden könnte, sondern sie wirkt nur als ein physikalischer Faktor, welcher das Hervortreten des Agglutinationsphänomens beschleunigen oder nicht beschleunigen kann. Es wurde außerdem noch durch 28 Versuche mit 10 Sera die Bedeutung der Temperaturen von 0°, 37° und ca. 55—60° für die Agglutinationsreaktion untersucht. Beim Ablesen der Reaktion nach 24 Std. oder später war kein entscheidender Einfluß der genannten Temperatur auf die Resultate der Agglutinationsreaktion zu verzeichnen. Beim Ablesen der Reaktion aber nach 1—3 Std. war zu beobachten, daß die Reaktion bei ca. 55° C weiter vorgeschritten war, als bei 37° C oder niedrigerer Temperatur.

I. Die Bedeutung des Antigens.

a) Dichte des Antigens.

Beim Arbeiten über Fragen der Milchagglutination stellte es sich anfangs heraus, daß ein und dasselbe Serum verschiedene Agglutinationswerte zeigen konnte. Die Agglutinationsproben wurden nach 24 Std. abgelesen und nach 48 Std. und meist auch noch nach 72 Std. kontrolliert. Anfangs arbeitete ich mit lebenden Kulturen, die in kleinen Quantitäten in nötiger Menge,

zubereitet wurden. Wenn es aus irgendwelchen Gründen notwendig war, eine Agglutinationsprobe nach einigen Tagen zu wiederholen, so wurde ein neues frisch hergestelltes Antigen benutzt. Oft erhielt ich beim Ablesen Resultate, die abweichend von den früher erhaltenen waren. Ich glaubte deswegen annehmen zu können, daß das Antigen einen Einfluß auf die Höhe des Agglutinationswertes hat. Weiter kam ich zu der Ueberzeugung, daß die Höhe des Agglutinationswertes dem Antigengehalt umgekehrt proportional sein muß. Ich führte eine Reihe von entsprechenden Versuchen mit Blut- und Milchsera, ebenso mit Magermilch durch.

Tabelle II.

Nr. der Versuche	Versuchsmaterial	Agglutinationswerte						Antigen	?Std. b.37°C	Beobachtet Tage
		Dichte des Antigens								
		8	4	2	1	1/2	1/4			
1	Rz Nr. 188 II	.	.	.	1280	2560	5120	Bang, frisch	14	3
2	Rz Nr. 188 II	.	.	.	2560	5120	±10240	,, ,,	6	3
3	Rz Nr. 419 II	.	.	.	640	1280	.	,, ,,	6	3
4	Msl Nr. 419 II	.	.	.	1280	2560	5120	,, ,,	6	3
5	Msl Nr. 188 II	.	.	.	1280	±2560	.	,, erhitzt bei 60° C Karbols. 0,5proz.	6	3
6	Magermilch Nr. 419 III	.	.	640	1280	.	.	,, dgl.	6	3
7	,, ,, 422 I	.	.	.	20	40	.	,, frisch	6	3
8	Msl Nr. 422 III	.	.	.	.	320	640	,, ,,	6	3
9	Msl Nr. 188 I	.	.	.	1280	2560	.	,, Formalin 0,2proz.	6	3
10	Bs Nr. 772	.	.	80	160	±320	.	Bang, frisch	6	3
11	Bs Nr. 771	.	.	20	±40	±80	.	,, ,,	6	3
12	Bs Nr. 694	.	.	40	±80	±160	.	,, ,,	6	3
13	Bs Nr. 724	.	.	320	640	1280	.	,, ,,	6	3
14	Bs Nr. 657	.	.	80	160	320	.	,, ,,	6	3
15	Bs Nr. 679	.	.	20	40	±80	.	,, ,,	6	3
16	Bs Nr. 689	.	.	.	10	20	40	,, ,,	6	3
17	Bs Nr. 689	.	.	.	10	20	40	,, ,,	6	3
18	Bs	.	200	400	800	1600	.	,, erhitzt Karbol 0,5proz.	5	3
19	Bs Nr. 572	.	160	320	640	1280	2560	Bang, dgl.	23	20
20	Bs Nr. 592	.	0	±2,5	2,5	5	10?	,, ,,	15	17
21	Bs Nr. 12	.	5	10	20	40	80	,, ,,	15	13
22	Bs Nr. 16	.	5	10	20	.	.	,, ,,	16	19
23	Bs Nr. 194	.	.	.	.	?25	50	,, ,,		3
24	Bs Nr. 200	.	.	.	.	50	100	,, ,,		3
25	Bs Nr. 203	.	.	.	.	50	100	,, ,,		3
26	Bs Nr. 958	.	.	.	.	25	50	,, ,,		3
27	Bs Nr. 136	.	.	.	.	12,5	25	,, ,,		3
28	Bs Nr. 147	.	.	.	.	12,5	25	,, ,,		3
29	Bs Nr. 247	.	.	.	.	12,5	25	,, ,,		3
30	Bs Nr. 10	80	160	320	640	1280	±2560	,, ,,	20	3
31	Bs Nr. 234	80	160	320	640	1280	2560	,, ,,	16	19
32	Bs Nr. H. 1224	.	20	40	80	.	.	,, ,,		16
33	Bs Nr. 1224	10	20	40	80	.	.	,, ,,	16	10
34	Bs	800	1600	3200	6400	12800	12800 / 25600	Pullorum	15	13
35	Bsm Nr. 1	.	640	1280	2560	5120	.	Paratyphus B	22	4
36	Bsm Nr. 2	.	160	320	640	1280	.	,, ,,	20	6
37	Bsm Lippus	.	320	640	1280	2560		Typhus	6	8
38	Bsm Eitsen	.	160	320	640	.	.	,,	7	5

Es bedeutet: Bs = Blutserum vom Rinde; Bsm = Blutserum vom Menschen; Rz = Rahm in physiologischer NaCl-Lösung verdünnt, zentrifugiert; Msl = Milchserum durch Lab erhalten.

Die Ergebnisse dieser Versuche mit 121 Agglutinationsreihen sind aus der Tabelle II ersichtlich. Die Technik der Agglutinationsproben war folgende: die Agglutinationsgläschen waren von 7½ mm Durchmesser mit je 1 ccm Serumverdünnung, denen je 1 gtt oder mehr Antigen hinzugefügt wurde. Die Dichte des Stammantigens (in der Tabelle als Dichte I angegeben) war folgende: 1 gtt Antigen + 1 ccm Serumverdünnung hatte eine Dichte, bei der durch eine Bangtestflüssigkeitssäule von 4 cm (bei Nr. 1—17), oder 2,8 cm (bei Nr. 18—33) Höhe die Druckschrift kaum lesbar war. Die Dichte des Antigens bei Nr. 34—38 war eingestellt nach der Opaleszenz des Antigens, welches bei Nr. 18—33 angewendet wurde. Bei den Versuchsreihen Nr. 18—39 wurden die zugefügten Tropfen des Antigens mit der Pipette — je 0,05 ccm — abgemessen. In der Tabelle ist angegeben, ob das Antigen als lebende oder abgetötete Kultur oder als konservierte Aufschwemmung der Agarkultur in NaCl-Lösung verwendet wurde. Die Dichte des Antigens 2, 4, 8 oder ½ und ¼ in der Tabelle bedeuten, daß die Dichte 2, 4, oder 8mal größer, oder ½ oder ¼ der gewöhnlichen Dichte 1 des Stammantigens ist. Ebenso ist dort ersichtlich, wie lange die Agglutinationsproben im Brutschrank bei 37° C standen, wonach sie bei Zimmertemperatur oder bei Rahm-, Magermilch- und Milchserumverdünnungen bei 0°—8° C aufgestellt waren. Die für die Versuche angewendeten Sera wurden vor dem Anlegen der Agglutinationsproben ausgewertet. Die angewendeten Antigene zeigten keine Spontanagglutination. In der Tabelle sind die endgültigen Agglutinationswerte dargestellt. Die Antigendichte ist in jedem Gläschen ein und derselben Reihe die gleiche. In den einzelnen Reihen ist sie aber verschieden — nämlich immer 2mal größer oder kleiner —, wie aus dem Schema ersichtlich ist. Zwar wurde jedem Gläschen der Agglutinationsreihe mit der Antigendichte 1—1 Tropfen (0,05 ccm) Antigen, bei der Antigendichte 2—2 Tropfen, bei der Dichte 4—4 Tropfen und bei der Dichte 8—8 Tropfen Antigen zugefügt. In der Reihe der Antigendichte ½ war das Antigen vor dem Zufügen auf die Hälfte und in der Reihe der Antigendichte ¼ — auf ¼ verdünnt.

Schema.
Agglutinationswerte der Kuh T 234.

Agglutinationsreihen	Antigendichte	Serumverdunnungen						
		40	80	160	320	640	1280	2560
1	8	+	+					
2	4	+	+	+				
3	2	+	+	+	+			
4	1	+	+	+	+	+		
5	½	+	+	+	+	+	+	
6	¼	+	+	+	+	+	+	+

Wie hier zu ersehen ist, liegt den Versuchen die Idee zugrunde, daß die Höhe des Agglutinationswertes in Abhängigkeit von der Dichte des Antigens steht. Bei diesem Schema werden die Agglutinationswerte stufenweise gebildet, indem jede folgende Agglutinationsreihe einen 2mal höheren Agglutinationswert hat. Die Wahl dieses Schemas ist wichtig, weil damit gezeigt werden kann, daß die Höhe des Agglutinationswertes in vollständiger Abhängigkeit von der Konzentration des Antigens steht. Ein und dasselbe Serum kann verschiedene Agglutinationswerte haben, die davon abhängig sind, wie dichtes Antigen zur Agglutinationsreaktion verwendet wird. Man kann auch sagen, daß die Menge des Agglutinins in einem betreffenden Serum

einem gewissen Antigenquantum entspricht. Es ist zweckmäßig, dabei den Agglutinationswert mit der Dichte des Antigens zu multiplizieren, z. B.

T 234	$80 \times 8 = 640$
	$160 \times 4 = 640$
	$320 \times 2 = 640$
	$640 \times 1 = 640$
	$1280 \times {}^1/_2 = 640$
	$2560 \times {}^1/_4 = 640$

Auf Grund dieses Schemas ist es möglich, verschiedene Agglutinationswerte miteinander zu vergleichen, wenn die Dichte des angewandten Antigens verschieden gewesen ist.

Auch bei der Agglutinationsprobe kann man den Agglutiningehalt eines bestimmten Serums durch verschiedene Agglutinationswerte ausdrücken. Z. B. die Agglutinationswerte der Rahmprobe 188 II waren 1:1280, 1:2560 und 1:5120, die entsprechenden Dichten des Antigens waren 1, ½, ¼. Blutserum Nr. 572 hat folgende Agglutinationswerte gezeigt 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280 und 1:2560 — abhängig davon ob die Dichte des Antigens 4, 2, 1, ½ oder ¼ war. Man kann deswegen sagen, daß das Blutserum Nr. 572 Agglutinationswerte von 1:160 bis 1:2560 hatte, doch muß man dabei erwähnen, daß im ersten Fall die Dichte des Antigens 4 war und im letzten Falle nur ¼. Der Agglutinationswert und die Dichte des Antigens müssen also immer parallel angegeben werden. Wenn die Dichte des Antigens nicht angegeben ist, so ist der Agglutinationswert eigentlich nicht fixiert.

Wenn man die Agglutinationsproben mit der Dichte des Antigens ½ und ¼ betrachtet, so bemerkt man hier eine Verspätung um einen bis einige Tage in der Bildung von Sediment in der Titerzone und zuweilen auch links von ihr. Bei Anwendung so verdünnter Antigene sind beim Ablesen der Reaktion Fehler möglich, weil die normale Opaleszenz der Flüssigkeit gering ist und Veränderungen in ihrer Dichte bei der üblichen Technik der Agglutinationsprobe nicht immer genau feststellbar sind. Auch die genannte Verspätung in der Bildung des Bodensatzes spielt hier eine verhältnismäßig große Rolle. Kleine Fehler und Ungenauigkeiten beim Bereiten der Serumverdünnungen haben größeren Einfluß auf das Resultat der Agglutinationsprobe, weil die zum Messen der Agglutininmenge dienende Antigenmenge klein ist. Diese genannten Umstände können bei Anwendung von sehr verdünnten Antigenen (¼ und ½) prozentual größere Abweichungen von dem absolut richtigen Resultat der Agglutinationsprobe zur Folge haben, als es bei Anwendung dichteren Antigens der Fall wäre. Wenn Stableforth (56) bei der Anwendung von verdünntem Antigen niedrigere Blutwerte erhielt als zu erwarten war, so ist diese Tatsache durch oben Gesagtes zu erklären.

Falls man die Antigendichten 2, 4, 8 anwendet, so ist die Meßeinheit des Antigens größer und deswegen der erhaltene Agglutinationswert niedriger. Dabei bleibt rechts vom Titerglas in der Titerzone verhältnismäßig viel Agglutinin übrig, das aber nicht imstande ist, das ganze Antigen im Gläschen zu sedimentieren. Auch kann ein umfangreicher Bodensatz, der meist aus agglutiniertem Antigen besteht, recht viel „ungesättigtes“ Antigen in sich einschließen und so sich unserer Beobachtung entziehen. Deswegen sind hier Ungenauigkeiten beim Ablesen der Resultate möglich und auch die objektiven Schätzungsverfahren zuweilen schwer anwendbar.

Aus diesen Gründen ist es nicht ratsam, bei ähnlichen Versuchen diese Reihe von Antigendichten im Sinne der größeren oder kleineren Dichte allzu sehr zu verlängern, weil dabei äußerst ungleiche Verhältnisse bei den Ver-

dünnungen an den Enden der Reihe entstehen, die Antigensediment nicht regelmäßig klar zustande kommen lassen.

Es ist möglich, solche Beobachtungen bei 2—3 Nachbar-Antigendichten genauer anzustellen, wo die Verhältnisse eher vergleichbar sind.

Aus den Versuchen, deren Ergebnisse in der Tabelle II dargestellt sind, kann man folgende Schlüsse ziehen:

1. Der erhaltene Agglutinationswert hängt davon ab, wie dichtes Antigen verwendet wurde, also 2mal dichteres Antigen gibt 2mal niedrigeren Agglutinationswert, ebenso 4-, 8mal dichteres Antigen gibt 4- und 8mal niedrigeren Agglutinationswert usw. und umgekehrt.

2. Die Agglutinationswerte verschiedener Forscher können nur miteinander verglichen werden, wenn die Dichte des Antigens angegeben ist und die Ablesung nicht zu früh stattgefunden hat. Dann ist es erst möglich, alle Agglutinationswerte auf eine gewünschte Dichte umzurechnen.

3. Man kann den Agglutiningehalt eines Serums auch durch die Antigenmenge ausdrücken (z. B. Agglutinationswert × Antigendichte, durch Anzahl der agglutinierten Bakterien des Antigens usw.).

4. Der Agglutinationswert allein drückt keinen genauen Serumwert aus, doch ist es möglich, letzteren durch Agglutinationswert plus Antigendichte auszudrücken.

Das sind Feststellungen, die man aus den Daten der Tabelle II ableiten kann, und die eine fehlerlose Arbeit erleichtern. Wie schon am Anfange dieser Arbeit hervorgehoben wurde, kann man im allgemeinen 3 verschiedene Ansichten über das Antigen feststellen.

1. Die Antigendichte wird bei Agglutinationsproben nicht berücksichtigt.
2. Die Dichte des Antigens muß konstant sein.
3. Die Dichte des Antigens ist wichtig für die Agglutinationsreaktion.

Mit der unter 1. genannten Ansicht stehen die hier erhaltenen Resultate im Widerspruch, mit der unter 2. genannten Meinung zwar nicht, doch decken sich die Ansichten nicht miteinander. Meinen Resultaten am nächsten kommt die unter 3. angeführte Meinung über die Wichtigkeit der Dichte des Antigens. Hier müssen besonders die Gesetze von Joos erwähnt werden, die schon im Jahre 1902 veröffentlicht wurden.

Die Gesetze von A. Joos besitzen mehr den Charakter eines Rahmengesetzes und können nicht mit jeder Agglutinationstechnik bewiesen werden. Aus diesen Gründen läßt sich vielleicht die Tatsache erklären, daß diese Gesetze nicht so bekannt geworden sind, wie es natürlich wäre.

Ganz zufällig bin ich auf ein anderes Gesetz der Antigen-Agglutininverbindung gestoßen. Ich habe Versuche der Agglutininsättigung mittels Antigen angestellt, wobei sich herausstellte, daß die Sättigungsresultate in verschiedenen Serumverdünnungen einer und derselben Agglutinationsreihe nicht vergleichbare Resultate ergeben. Als ich später mit der Arbeit von Joos bekannt wurde, kam ich zu dem Schluß, daß dieses das von ihm genannte II-Gesetz der Antigen-Agglutininverbindungen sein könnte. Doch könnte diese Erscheinung auch zu jener Gruppe der Agglutinationsphänomene gehören, von der Eisenberg u. Volk berichten, daß nach ihren Versuchen die Absorption nicht immer proportional erfolgte. — Diese Frage habe ich aber keiner eingehenden Untersuchung unterworfen, weil sie für die praktische diagnostische Agglutinationsprobe bei der hier angewandten Technik keine große Bedeutung zu haben scheint.

b) Bedeutung der Stämme des Brucella-Antigens.

Blut-sera	Gestanden bei 37° C Std.	Beob-achtet Tage	Agglutinationswerte der Blutsera					
			Antigen besteht aus Brucella-Stammen					
			Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 4	Gemisch aus 5 Stammen	Gemisch aus X Stammen
1	20	20	1280	1280	1280	1280	1280	1280
2	20	20	80	80	80	80	80	80
3	20	20	80	80	80	80	80	80
4	20	20	80	80	80	80	80	80
5	20	20	±10	±10	±10	±10	±10	±10
6	16	6	640	640	640	640	640	640

Alle gebrauchten Antigene hatten einen gleichen Opaleszenzgrad, wurden 1 Std. bei 60° C erwärmt und mit 0,5 Proz. Phenol konserviert. Beim Ablesen wurde die Agglutination als positiv betrachtet, wenn das Antigensediment 0—20 Proz. beweglich war. Mit allen Stämmen wurden die gleichen Agglutinationswerte erhalten.

Außerdem habe ich noch 72 Bang-Stämme mit ein und demselben spezifischen Bang-Serum ausgewertet. Die Serumverdünnungen waren von 1:12800 bis 1:1638400. Von jeder Verdünnung wurden 50 ccm bereitet. Davon wurden für jeden Stamm die betreffenden Verdünnungen — je 0,5 ccm — abgemessen, wodurch alle Stämme möglichst gleichwertige Serumverdünnungen erhielten. In jedes Gläschen einer jeden Agglutinationsreihe wurde später je 0,5 ccm Bangtest von einem bestimmten Bang-Stamm zugefügt. Die Stämme waren nach 4monatigem dauernden Stehen frisch überimpft worden. Ein jedes Schrägagarröhrchen mit 2—4tägigen Bang-Rasen wurde mit physiol. Kochsalzlösung (+ 0,5proz. Phenol) abgeschwemmt und durch Papierfilter filtriert. Letztere Aufschwemmungen standen einige Tage verkorkt, wonach ihre Dichte nach dem Standardantigen eingestellt wurde. Dann standen sie wieder einige Tage, wonach die Dichte kontrolliert und nötigenfalls korrigiert wurde. Die Kontrolle der Dichte wurde beim Ansetzen der Agglutinationsproben wiederholt. Die Agglutinationsröhrchen hatten einen inneren Durchmesser von 10 mm. Die Proben wurden 20 Std. bei 37° C bebrütet und standen später unter Zimmertemperatur.

Von 72 Stämmen hatten nach dem breiten Bodensatz 70 Stämme denselben Titer, und nach der Beweglichkeit des Sedimentes hatten 71 Stämme denselben Agglutinationswert. Doch bei einigen Stämmen war in der Verdünnung 4 (also 1:102400) eine Verspätung, um einen Tag in der Sedimentbildung zu beobachten. Abweichung in dem Agglutinationsphänomen zeigten die Stämme M 23 und M 29. Der Stamm M 29 hatte eine normale Bindungsfähigkeit (nach der Beweglichkeit des Bodensatzes bestimmt). Doch wies dieser Stamm anfangs in der Titerzone nicht den gewöhnlichen breiten Bodensatz auf. Nach mehrmaliger Ueberimpfung kam aber der breite Bodensatz in der Titerzone wieder zum Vorschein. Der zweite abweichende Stamm M 23 hatte einen Agglutinationswert, der nach dem breiten Bodensatz bestimmt 64mal niedriger war als bei den anderen Stämmen. Letztere Erscheinung blieb auch nach mehrmaliger Ueberimpfung des Stammes bestehen. Auch in der Beweglichkeit des knopfartigen Sedimentes war keine genügende Regelmäßigkeit zu beobachten.

Um festzustellen, ob die Titer praktisch beeinflußt werden oder nicht, wenn einem normal arbeitenden Antigen Bakterienaufschwemmung von den Stämmen M 23 und M 29 zugefügt wird, wurden einige Versuche ausgeführt.

Letztere wurden doppelt, mit parallelen Agglutinationsreihen angelegt, um mögliche Fehler auszuschalten. Die Resultate sind folgende:

Gemischtes Antigen:

1) enthält Antigen vom Stamm M 23 — 50 Proz. — normaler Titer
2) „ „ „ „ M 23 — 25 „ — „ „
3) „ „ „ „ M 29 — 50 „ — praktisch normaler Titer
4) „ „ „ „ M 29 — 25 „ — „ „ „

Im Falle 3 und 4 war eine Verzögerung in der Aufklärung der Flüssigkeit und Sedimentbildung in der Titerzone bemerkbar.

Es wurden noch 5 Antigene zu gleichen Teilen gemischt von solchen Stämmen, die bei der Agglutinationsreaktion schneller einen Bodensatz bildeten. Außerdem wurden weitere 5 Antigene in gleicher Weise aus solchen Stämmen gemischt, die eine verzögerte Sedimentbildung aufwiesen. Beide Antigengemische hatten praktisch denselben Agglutinationswert, nur zeigte das letztere Gemisch eine kaum merkbare Verspätung der Reaktion. Die Stämme M 23 und M 29, im Antigengemisch angewendet, konnten die Reaktion und Agglutinationswerte nicht bedeutend beeinflussen.

c) Können ältere Bang-Bakterienrasen zur Antigenbereitung verwendet werden?

Es wurden 12 verschiedene Brucella-Stämme, die vor 4 Monaten auf Glukoseagar überimpft und mit paraffinierten Zellstoffstopfen verschlossen waren, nach hier früher beschriebener Weise zur Antigenbereitung benutzt. Letztere wurden parallel mit aus frischen Bang-Kulturen hergestellten Antigenen durch spez. Bang-Serum ausgewertet. Alle genannten 12 Antigene haben denselben Agglutinationswert aufgewiesen, wie die Antigene aus frischen Bang-Kulturen. Doch bei 7 Antigenen aus alten Bang-Kulturen war eine Verspätung (um ein bis mehrere Tage) in der Bildung von Bodensatz in der Titerzone (in der Verdünnung 1 : 102400) zu beobachten. Danach ist es möglich, auch ältere Bang-Agarkulturen zur Antigenbereitung zu verwenden.

d) Agarnährbodensubstanz im Bang-Antigen.

Der Agar im Agarröhrchen wurde zerstückelt, mit Phenolkochsalzlösung kräftig geschüttelt und die erhaltene „Abschwemmung“ durch Papierfilter filtriert. Die erhaltene Flüssigkeit hatte eine Opaleszenz von 10—20 % des Standardtestes. Falls die Bang-Kultur abgeschwemmt wird und das erhaltene Antigen ebensoviel Agarsubstanz enthält, wie eben beschrieben, so erhält es 10—20 % Bang-Bakterienmasse weniger als erwartet. — Deswegen muß der durch dieses Antigen erhaltene Titer höher werden als normal.

Ebenso wurden 3 Antigene aus verschiedenen Bang-Stämmen bereitet (Agar zerstückelt) und mit spez. Bang-Serum parallel mit normalen Bang-Antigenen ausgewertet. Die erhaltenen Agglutinationswerte waren 2mal höher als normal, außerdem zeigte ein Antigen bedeutende Hemmung in der positiven Titerzone: der Bodensatz fing erst am 5. Tage an, sich auszubilden. Der Titer der negativen Zone war schon nach 24 Std. bestimmbar. In allen Fällen hatte die Agarnährbodensubstanz im Antigen einen ungünstigen Einfluß auf die Agglutinationsprobe ausgeübt.

e) Lebende, erwärmte und konservierte Brucella-Antigene.

4 Brucella-Stämme wurden einzeln auf eine Anzahl von Agarröhrchen geimpft und nach 2tägiger Bebrütung bei 37° C mit physiologischer NaCl-Lösung abgeschwemmt. Das so erhaltene Antigen wurde gut durchgeschüttelt und in gleichen Teilen abgemessen.

Der 1. Teil wurde lebend gebraucht.
„ 2. „ „ mit Phenol versetzt.
„ 3. „ „ „ Formalin versetzt.
„ 4. „ „ auf 60° C erwärmt und mit Phenol versetzt.

Danach wurden sehr sorgfältig und genau von jedem Serum die gleichen Serumverdünnungsreihen bereitet und für jede Verdünnungsreihe eins der genannten Antigene zugesetzt (je 0,05 ccm). Alle Agglutinationsreihen wurden gleichzeitig und unter denselben Bedingungen bereitet und aufbewahrt. Die aus dem Brutschrank entfernten Agglutinationsgläschen wurden bei 3° C aufgestellt.

Blut-Serum	Antigen	Agglutinationsproben		
		Gestanden bei 37° C Stunden	Beobachtet Tage	Agglutinationswert
1	Antigen 1 Lebende Kultur	6	3	160
	2 Konserviert mit Phenol (0.5 %)	6	3	160
	3 Konserviert mit Formalin (0,1 %)	6	3	160
2	Antigen 1 Lebende Kultur	6	3	40
	2 Konserviert mit Formalin (0,1 %)	6	3	40
3	Antigen 1 Lebende Kultur	5	3	40
	2 60° C 1½ Std. + 0,5 % Phenol	5	3	40
	3 0,1 % Formalin	5	3	40
4	Antigen 1 Lebende Kultur	5	3	20
	2 60° C — 1½ Std. + 0,5 % Phenol	5	3	20
	3 0,1 % Formalin	5	3	20
5	Antigen 1 Lebende Kultur	5	3	640
	2 60° C — 1½ Std. + 0,5 % Phenol	5	3	640
	3 0,1 % Formalin	5	3	640
6	Antigen 1 Lebende Kultur	16	20	1280
	2 Lebende Kultur + 0,5 % Phenol	16	20	1280
	3 Lebende Kultur + 0,2 % Formalin	16	20	1280
	4 60° C erwärmt mit 0,5 % Phenol versetzt	16	20	1280
7	Antigen 1 Lebende Kultur	16	13	80
	2 Lebende Kultur + 0,5 % Phenol	16	13	80
	3 Lebende Kultur + 0,2 % Formalin	16	13	80
	4 erwärmt (1 Std 60° C) + 0,5 % Phenol	16	13	80
8	Antigen 1 Lebende Kultur	16	13	80
	2 Lebende Kultur + 0,5 % Phenol	16	13	80
	3 Lebende Kultur + 0,2 % Formalin	16	13	80
	4 erwärmt (1 Std. 60° C) + 0,5 % Phenol	16	13	80

Lebende, konservierte (mit 0,5 % Phenol oder 0,1—0,2 % Formalin) und erwärmte mit Phenol konservierte Antigene haben also gleich hohe Agglutinationswerte ergeben.

f) Alter des Brucella-Antigens.

Die oben angegebenen Versuchsresultate zeigen, daß das Alter des Antigens keinen Einfluß auf die Höhe des erhaltenen Agglutinationswertes ausgeübt hat. Die Dichte aller Antigene wurde gleichzeitig nach der Opaleszenz eingestellt, nach einigen Tagen kontrolliert und nötigenfalls korrigiert und nochmals kontrolliert. Sämtliche genannten Versuche wurden mit alten Laboratoriumsstämmen ausgeführt.

Blutserum	Alter des Antigens	Gestanden bei 37° C Stunden	Beobachtet Tage	Agglutinations-wert
1	3 Jahre	16	6	640
	2 Jahre	16	6	640
	1 Jahr	16	6	640
2	0 (frisch zubereitet)	16	20	1 280
	3 Jahre	16	20	1 280
3	0 (frisch)	16	13	80
	3 Jahre	16	13	80
4	0 (frisch)	16	13	80
	3 Jahre	16	13	80
5	3 Jahre	20	20	80
	1 Jahr	20	20	80
6	3 Jahre	20	20	± 10
	1 Jahr	20	20	± 10
7	3 Jahre	20	20	1 280
	1 Jahr	20	20	1 280
8	3 Jahre	20	20	80
	1 Jahr	20	20	80
9	3 Jahre	20	20	80
	1 Jahr	20	20	80
10	0 (frisch)	18	6	102 400
	2,6 Jahre	18	6	102 400

Alle hier nach den Grundprinzipien des absoluten Verfahrens der Agglutinationsreaktion durchgeführten Versuche erlauben die Behauptung aufzustellen, daß das Bang-Antigen — im Rahmen des absoluten Verfahrens angewendet — sehr konstante agglutinable Eigenschaften besitzt, die nicht abhängig sind von Zubereitungsweisen (lebend, erwärmt, mit 0,5 % Phenol oder 0.1—0,2 % Formalin konserviert), und Alter des Antigens (mind. bis 3 Jahre) und meist nicht von angewandten Brucella-Stämmen.

II. Das absolute Verfahren der Agglutinationsprobe.

Die Bedeutung der Agglutinationstechnik für die Resultate der Agglutinationsprobe veranschaulichen nachfolgende Beispiele.

Ich habe in meinem Artikel: „Wie ändert sich der Agglutinationswert im Zusammenhang mit der Dauer der Beobachtungszeit?“ (67) Beispiele dafür angeführt, wie ein Serum viele Agglutinationswerte haben kann. So hatte z. B. eine Kuh die Blutwerte von 1 : 20 bis 1 : 640 bei ein und derselben Antigendichte 1. Wenn wir bei einem Agglutinationswert von 1 : 20 statt der Antigendichte 1 noch die Dichten 2, 4, 8 anwenden würden, so könnten wir meist noch die Agglutinationswerte 1 : 10, 1 : 5 und 1 : 2,5 feststellen, falls wir entsprechende Zeitpunkte zum Ablesen wählen. Da wir es hier infolge zu frühen Ablesens mit relativen Agglutinationswerten zu tun haben, so brauchen nicht jedesmal alle genannten Agglutinationswerte feststellbar zu sein. Wenn man statt der Antigendichte 1 beim Agglutinationswerte 1 : 640 die Dichte ½ und ¼ anwenden würde, so könnte man neue sichere Agglutinationswerte, und zwar von 1 : 1280 und 1 : 2560 erhalten, wenn das Ablesen nach einer genügenden Zeitdauer erfolgt.

Im letzteren Falle haben wir es mit absoluten endgültigen Resultaten zu tun, die nie ausbleiben. So können wir unter den geschilderten Bedingungen

bei diesem Serum die Agglutinationswerte von 1 : 2,5 bis 1 : 2560 erhalten; der letzte ist also 1000mal höher als der erste. Die einzelnen Agglutinationswerte sind nicht alle konstant, weshalb man sie nicht alle zu wissenschaftlichen Zwecken verwenden kann. Die niedrigen Werte können auch nicht zu diagnostischen Zwecken gebraucht werden.

Nur wenn wir die Beschreibung der Technik der Agglutinationsprobe hinzufügen, können wir die betreffenden absoluten Serumwerte finden und sie auch praktisch gebrauchen. Dadurch läßt sich erklären, daß verschiedene Laboratorien, oder verschiedene Arbeiter in einem Laboratorium oder ein und derselbe Forscher zu verschiedener Zeit für dasselbe Serum einen verschiedenen Agglutinationswert gefunden haben. Ebenso lassen sich dadurch viele Differenzen in den wissenschaftlichen Arbeiten erklären, wo bei gleichlautenden Versuchen verschiedene Resultate von verschiedenen Forschern erhalten worden sind. Um Möglichkeiten auszuschließen, die zu unkonstanten Resultaten führen können, habe ich eine Agglutinationstechnik ausgearbeitet, die den Arbeiter vor solchen unerwünschten Möglichkeiten schützen soll. Ich habe die Methode „absolutes Verfahren" der Agglutinationsreaktion genannt, weil damit absolute, endgültige und konstante Resultate erzielt werden.

Nicht die äußerlichen Handgriffe der Technik, sondern die Grundprinzipien sind es, welche es erlauben, ein Verfahren zu der „absoluten" oder „relativen" Gruppe zu zählen. Auch in dem „absoluten Verfahren" sind Variationen der Technik möglich, doch müssen diese Variationen den Grundideen angepaßt sein.

Beim absoluten Verfahren kann die Agglutinationsreaktion spätestens abgelesen werden, nachdem das Antigen in den Agglutinationsgläschen endgültig sedimentiert ist, d. h. in einen agglutinierten und einen nichtagglutinierten Teil geschieden ist. Die agglutinierten Antigenbakterien sind nicht immer alle in der Suspension zu erkennen und zu bestimmen, wohl aber wenn sie zu Boden gesunken sind. Beim Ablesen der Resultate der Agglutinationsreaktion sollen die subjektiven Schätzungen möglichst vermieden und statt dessen womöglich überall objektive Bestimmungsmethoden angewendet werden. Das absolute Verfahren soll das Finden eines Agglutinationswertes gestatten, dessen Höhe bei jeder weiteren Agglutinationswertbestimmung des betreffenden Serums die gleiche bleibt, wenn alle notwendigen Abmessungen der Flüssigkeiten bei der Agglutinationsprobe genau beobachtet werden. Dieser Agglutinationswert nach dem absoluten Verfahren kann niemals übertroffen werden von einem anderen Resultat einer Agglutinationswertbestimmung des betreffenden Serums, weil er der maximale Titer ist, den ein Serum haben kann. Ein jeder andere Agglutinationswert kann nur niedriger sein als der nach dem absoluten Verfahren bestimmte.

Bei dem absoluten Verfahren müssen Serum und Antigen sehr genau abgemessen werden. Die Gläschen bleiben bei einer Temperatur, die zur Beschleunigung der Reaktion erforderlich ist, stehen. Abgelesen wird das Resultat nach dem definitiven Bodensatze, wobei die angewandte Temperatur und Ablesezeit nur als beschreibende Momente der Agglutinationsreaktion geschildert werden. Bei der Bestimmung des Resultates bedient man sich der Begriffe: Zonen der Agglutinationsreihe, Agglutinationsgefälle, Beweglichkeit des Sedimentes, Opaleszenzgrad der Flüssigkeit und Verklumpung der Antigenbakterien.

Das absolute Verfahren besteht aus folgenden Komponenten: genaues Abmessen des Serums und Antigens; Antigen; Ablesezeit; genaues Ablesen der Resultate; genaues Aufzeichnen der Resultate; Verhinderung der Bildung

von Sedimenten, die nicht aus dem Antigen stammen; Kontrolle der Agglutinationsreaktion; Kontrolle des Agglutinationswertes; Temperaturfrage und Agglutinationsgläschen.

Genaues Abmessen der Flüssigkeiten.

Die Abmessungen des Serums und des Antigens müssen sehr genau vollzogen werden, wobei die Handgriffe der chemischen maßanalytischen Arbeiten berücksichtigt werden müssen. Adhäsionserscheinungen und nicht genau kalibrierte Meßpipetten können oft große Fehler der Resultate verursachen.

Das Antigen.

Das Antigen in der Agglutinationsprobe dient zum Messen der Agglutininmenge in dem zur Untersuchung verwendeten Serum. Deshalb muß das Antigen, als Meßeinheit eine genau definierte Größe — hier Dichte genannt — besitzen. Wie schon früher berichtet wurde, kann die Dichte des Antigens auf verschiedene Weise normiert werden oder durch Probetitrieren des Antigens mit einem Serum von bekanntem Agglutinationswert verglichen werden. Dabei ist es wünschenswert, die Dichte des Antigens so zu wählen, daß die Agglutinationsreaktion leicht und genau sich vollziehen kann. Für die endgültige Dichte des Bang-Antigens in 1 ccm Antigenserumverdünnung könnte die hier erwähnte Dichte 1 oder 2 gewählt werden. Die Dichte 1 erlaubt genügend exakte und differenzierte Titerbestimmung bei den hier angewandten Agglutinationsgläschen von ca. 8 mm innerem Durchmesser. Wenn zur Agglutinationsprobe viel breitere Gläschen angewendet werden, so wird das Ablesen der Reaktion weniger bequem. Im letzteren Falle ist es leichter, mit der Dichte 2 zu arbeiten, doch wird dabei die Meßeinheit des Antigens gröber und die Titerbestimmung dabei weniger empfindlich werden. Bei der Bang-Infektionsdiagnose könnte die Agglutinationsreaktion bei ca. 500 Millionen bis 1000 Millionen Bakterien in 1 ccm sich vollziehen. Die Dichte von 250 Millionen Keimen in 1 ccm scheint zu dünn zu sein bei Agglutinationsgläschen von ca. 8 mm Durchmesser, weil dabei oft eine Verspätung der Reaktion zu sehen ist, und die Meßfehler des Serums prozentual größeren Einfluß ausüben können.

Um ein genaues Messen einer Agglutininmenge zu ermöglichen, muß die Dichte des Antigens während der Agglutinationsreaktion konstant bleiben, also die Antigenbakterien dürfen dabei keine Vermehrungsmöglichkeiten besitzen. (Getötete oder konservierte Kulturen, hohe oder niedrige Temperaturen bei der Agglutinationsreaktion.) Getötetes konserviertes Antigen muß als das Idealste angesehen werden, weil man größere Mengen einheitlichen Antigens auf einmal anfertigen kann und so viel Standardisierungsarbeit des Antigens erspart. Es ist ratsam, solche Konzentrationsmessungsweisen anzuwenden, die leicht und zugänglich für alle sind: z. B. 1. Vergleich mit einem Standardantigen, 2. Lesen einer Druckschrift durch eine Antigensäule von bestimmter Höhe, 3. Zählen der Bakterienzahl in 1 ccm Testflüssigkeit usw. Die Grade der Nephelometer sagen dem Leser nichts, wenn er das betreffende Nephelometer selbst nicht besitzt. Beim Schätzen der Dichte durch das Sediment muß mitgeteilt werden, wie das Sediment zu erhalten ist, weil die Größe des letzteren von der Methode abhängig sein kann.

Wenn die Agglutininmenge eines Serums nicht durch die Titerhöhe bei bestimmter Antigendichte ausgedrückt wird, sondern durch die Menge (Masse) der Antigenbakterien, so hat die Standarddichte des Antigens geringere Wichtigkeit. Dann genügt es, wenn die Dichte des Antigens nur bekanntgegeben wird, abgesehen davon, ob sie groß oder klein ist.

Es wäre zweckmäßig, Bang-Kulturen für Antigenbereitung nach einheitlichen Vorschriften überall auf einem und demselben Nährboden zu züchten. Jeder Bakterienrasen müßte nach der Abschwemmung mit Karbolkochsalzlösung auf Reinheit, Agglutinabilität und Spontanagglutination geprüft werden. Auch ist es zweckmäßig, die Standarddichte des Antigens in der endgültigen Verdünnung des Antigens zu prüfen, weil damit kontrolliert wird, ob sich die Agglutinationsreaktion bei der gewünschten Antigendichte vollzieht. Die Dichte muß, falls sie nach der Opaleszenz der Standardflüssigkeit abgestimmt wurde, nach 5—10 Tagen nachkontrolliert werden. Wenn schlecht wachsende Stämme von der Antigenbereitung ausgeschlossen werden, so kann man annehmen, daß das Antigen genügend konstante agglutinable Eigenschaft besitzt. Die Anwendung mehrerer Stämme müßte den Vorteil bieten, daß kleine Abweichungen in der Agglutinabilität der Stämme paralysiert werden können. In diesem Falle könnte die Forderung von Frei (12), daß die Bang-Stämme für das Antigen von einer internationalen Zentralstelle versandt werden müßten, vorläufig als überflüssig erscheinen. Wohl würde es ratsam sein, daß aus einer internationalen Zentralstelle Bang-Test von Standarddichte (endgültige Dichte der Serum-Antigen-Verdünnung) beziehbar wäre. Letztere müßte in zugeschmolzenen Agglutinationsröhrchen von solcher Art aufbewahrt werden, wie sie zu Agglutinationsproben im betreffenden Laboratorium angewendet werden. Sie können nach einem Schütteln leicht zur Kontrolle der Dichte eines beliebigen Agglutinationsgläschens angewendet werden. Es ist leichter, den Bang-Test nach diesem Standardantigen zu standardisieren, als mit $BaSO_4$-Aufschwemmung zu vergleichen, weil letztere meist eine andere Nuance der Opaleszenz zeigt, als das Bang-Antigen.

Das Antigen muß für jedes Agglutinationsgläschen sehr genau abgemessen werden. Es ist z. B. nicht gleich, ob man einem Gläschen 1 oder 2 gtt Antigen zufügt. Einfacher und exakter ist es bei der Tropfmethode die Tropfen mit der Meßpipette abzumessen, im entgegengesetzten Falle ist es notwendig, die Tropfen abzueichen und später nur dieselbe Pipette in derselben Haltung anzuwenden, wie beim Eichen der Tropfen. Es ist wichtig, daß die Antigentropfen restlos in die Serumverdünnungen gelangen, ohne an den Gläschenwänden haften zu bleiben. Wieviel Antigen man schließlich einem Agglutinationsgläschen hinzufügt, hängt von der Dichte des Antigens und von der erwünschten Antigendichte der Serumverdünnung ab. Leichter ist es, Antigen im verdünnten Zustande exakt abzumessen, von dem man z. B. $\frac{1}{2}$ oder 1 ccm abmessen kann, wobei die Meßfehler geringer werden.

Zeitpunkt des Ablesens der Agglutinationsreaktion.

Dem „absoluten Verfahren“ liegt als wichtiges Prinzip zugrunde, daß das Resultat nicht früher endgültig abgelesen werden darf, als der höchste Titer bestimmbar ist. Dabei erhält man konstante Agglutinationswerte, die keinen Veränderungen mehr unterliegen können. Bei Anwendung von Bang-Antigenen und bei der hier beschriebenen Technik der Agglutinationsprobe kann dieser Zeitpunkt oft erst nach ca. ein bis mehreren Wochen eintreten, besonders wenn nicht Blutserum, sondern andere träger agglutinierende Flüssigkeiten angewendet werden (wie Milch usw.). Dieser Umstand ist für das Laboratorium unbequem, und daher muß praktisch diese Ablesungszeit meist verkürzt werden. Wenn die Reaktion in drei Tagen je einmal beobachtet wird, so erhält man Daten, die die Dynamik des Steigens des Agglutinationswertes zeigen. Sie ermöglichen eine Uebersicht darüber, ob die Steigerung des Titers beendet ist und ein konstanter Agglutinationswert erreicht ist. Ebenso erlaubt dieses Verfahren Unregelmäßigkeiten in der Agglutinations-

reaktion zu bemerken und annähernde Agglutinationswerte in dem Falle zu erhalten, wenn unspezifische Sedimente gebildet werden. (Als Agglutinationswert benutzt man den letzten als normal betrachteten Agglutinationswert.) Das mehrmalige Ablesen der Agglutinationsreaktion muß sehr vorsichtig geschehen, um kein Aufwirbeln des sedimentierenden Antigens zu veranlassen.

Viel einfacher ist wohl ein einmaliges Ablesen der Resultate, das desto mehr konstante Werte gibt, je länger die Agglutinationsgläschen gestanden haben. Wenn aber die Serumverdünnung einen unspezifischen Bodensatz nach einem langen Stehen gebildet hat, so kann oft ein mehrmaliges Ablesen von Nutzen sein, weil die vorzeitigen Resultate einer Beobachtungsreihe gute Dienste leisten können.

Ich habe hier keine ungefähren, für praktische Zwecke bestimmten Ablesungszeiten fixiert. Denn diese müssen erst experimentell derjenigen Technik angepaßt werden, die womöglich endgültig international für die Agglutinationsreaktion bei Bang- und anderen Infektionen festgelegt werden soll. Die Art des Antigens (der Bakterien), die Art der Agglutinine enthaltenden Flüssigkeit, die zur Agglutinationsreaktion verwendet wird, der Durchmesser der Agglutinationsgläschen, die Dichte des Antigens in der endgültigen Serumantigenverdünnung und die angewandte Temperatur, alle beeinflussen gewissermaßen die Schnelligkeit der Reaktion. Ebenso ist die Ablesezeit von dem Ableseverfahren abhängig. Wenn diese Komponenten festgestellt sind, so ist es auch leichter, eine passende Ablesezeit für jeden Fall zu bestimmen. Außerdem scheint es noch unbekannte Faktoren zu geben, die zuweilen die Reaktion fördernd oder hemmend beeinflussen können. Letztere Möglichkeit beruht auf der Tatsache, daß oft bei parallel angestellten doppelten Proben von ein und demselben Serum die eine schneller den endgültigen Agglutinationswert zeigt, als die andere.

Verkürzung der Ablesezeit.

Vorzeitiges Ablesen der Agglutinationsreaktion muß so geschehen, daß dadurch keine Fehler der Titer möglich werden. Hauptsächlich für die Zwecke der Diagnose kann die Reaktion früher abgelesen werden: 1. wenn eine jede partielle Agglutination als positive Reaktion angesehen wird; 2. wenn man z. B. statt mit 1 ccm mit 0,5 ccm Serumantigenverdünnung arbeitet oder breite Agglutinationsgläschen anwendet; 3. wenn man die Reaktion vermittels eines Agglutinoskopes, Mikroskopes oder einer Lupe abliest; 4. wenn die Proben geschüttelt werden oder wenn durch die Temperaturdifferenz Strömungen in der Flüssigkeit erzeugt werden; 5. wenn die Proben zentrifugiert werden; 6. wenn man den Titer der negativen Zone bestimmt, falls dieser früher ausgebildet ist, als der Titer der positiven Zone. Für die Bang-Diagnose wird bei der hier angewandten Technik und bei gut arbeitenden Sera meist die 48stünd. Beobachtung für praktische Zwecke genügen. Bei Typhus-Paratyphus-Diagnose kann die Reaktion früher abgelesen werden, weil sie meist schneller abläuft. Hierbei muß noch erwähnt werden, daß die Reaktion für die Zwecke der Diagnose, besonders bei hohen Blutwerten, meist vor dem endgültigen Ablauf abgelesen werden kann.

Genaues Ablesen und Aufzeichnen der Resultate.

Zu jeder Zeit und für jeden Zweck benutzbare Resultate kann man bei der Agglutinationsreaktion erhalten, wenn alle Agglutinationsphänomene möglichst genau und vielseitig charakterisiert werden. Beim Ablesen der Reaktion müssen beachtet werden: 1. die Opaleszenz der Flüssigkeit, 2. der Bodensatz, 3. die Beweglichkeit des Sedimentes, 4. die Verklumpung der

Antigenbakterien bei der positiven Reaktion. Das Verschwinden der Opaleszenz der Agglutinationsflüssigkeit durch Sedimentieren der Antigenbakterien wird als ein Hauptphänomen der positiven Agglutinationsreaktion betrachtet. Deswegen ist es wichtig, die Aufhellung der Agglutinationsflüssigkeit, d. h. den Opaleszenzgrad zu bestimmen, was nicht leicht mit bloßem Auge möglich ist. Zweckmäßig ist es, hierzu eine Reihe opaleszierender Standardflüssigkeiten als objektive vergleichende Meßeinheit zu benutzen, die man leicht selbst herstellen kann. Man nimmt dazu eine Reihe von Agglutinationsgläschen und mißt darin genau 1,0; 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1 ccm Bang-Testflüssigkeit mit 0,5 % Phenol und danach entsprechend 0,0—0,9 ccm physiolog. NaCl-Lösung, der 0,5 % Phenol hinzugefügt ist, so daß jedes Gläschen schließlich 1 ccm Flüssigkeit enthält. Darauf lötet man die Gläschen zu und klebt die betreffenden Etiketten mit Aufschrift auf. Auf diese Weise erhalten wir eine Reihe von Gläschen mit der Opaleszenz von 100 % bis 0 % des Antigens. Mit dieser Reihe können wir jegliche Antigenflüssigkeiten vergleichen und deren Opaleszenz bestimmen. Vor jedem Gebrauch muß man die Gläschen gut schütteln. Die dazu benutzten Gläschen müssen von derselben Sorte sein, wie sie zur Agglutinationsprobe angewendet werden. Den Opaleszenzgrad der Flüssigkeiten habe ich auf zweierlei Weise aufgezeichnet: a) durch Punkte und Striche über den Ziffern, die den Bodensatz angeben, oder b) durch den Opaleszenzgrad, ausgedrückt in % des Antigens, z. B. bei breitem Bodensatz und Flüssigkeit darüber bei einem Opaleszenzgrad des Antigens von: 10 % = $\dot{3}$ oder 3^{10}; 20 % = $\ddot{3}$ oder 3^{20}; 30 % = $\dddot{3}$ oder 3^{30}; 40 % = $\bar{3}$ oder 3^{40} usw. Beim Bestimmen des Opaleszenzgrades ist es wichtig, nicht zu vergessen, daß dieser sich verändern kann: 1. durch teilweisen Ausfall der Antigenbakterien aus der Agglutinationsflüssigkeit, also bei der Bildung von Bodensatz; 2. wenn der Dispersionsgrad der suspendierten Antigenbakterien sich verändert, was bei partieller und totaler Verklumpung der Antigenbakterien der Fall ist, wenn die verklumpten Partikelchen noch in der Flüssigkeit schweben und noch nicht zu Boden gesunken sind. (Die optischen Eigenschaften einer Suspension sind abhängig von dem Dispersionsgrad der suspendierten Partikelchen.) Da die obengenannten Gläschen unverklumptes Antigen verdünnt enthalten, so geben sie genauere Resultate beim Bestimmen des Opaleszenzgrades der negativen, weniger der Titerzone. In der positiven Zone sind sie aber von geringerer Wichtigkeit und nicht geeignet, den agglutinierten Anteil des Antigens zu bestimmen. Hier dienen sie mehr zur Beschreibung des Opaleszenzgrades.

Ein zweites Merkmal der positiven Reaktion ist die Bildung von breitem Bodensatz in den Agglutinationsgläschen. Es ist ratsam, die Eigenschaften des Bodensatzes — hauptsächlich ihre Breite und Dicke — aufzuzeichnen, weil man damit die Möglichkeit erhält, die ungefähre Größe des Anteils der agglutinierten und zu Boden gesunkenen Bakterien zu bestimmen. Die Breite des Bodensatzes habe ich meist nach 4stufigem System aufgezeichnet, und zwar bedeutet „n" einen knopfartigen Bodensatz bei negativer Agglutination, 1 einen schmalen, 2 mittleren und 3 einen breiten Bodensatz bei positiver Reaktion. Nur in Ausnahmefällen — bei zu dichtem Antigen habe ich eine 5- oder 10stufige Schätzung angewendet. Die Dicke des Bodensatzes habe ich in folgender Weise aufgezeichnet: Wenn der Bodensatz von gewöhnlicher Dicke war, was der Fall ist, wenn alle Antigenbakterien breit über den ganzen Boden sedimentiert sind, habe ich nur die Breite des Bodensatzes aufgezeichnet, die Dicke aber nicht. Wenn die Dicke des Bodensatzes aber geringer als gewöhnlich war, so habe ich sie mit einem oder zwei Strichen unter der

Bodensatzziffer verzeichnet: $\underline{3}$ bedeutet einen dünnen, breiten Bodensatz, $\underline{\underline{3}}$ einen kaum mit bloßem Auge bemerkbaren dünnen, breiten Bodensatz (mit der Lupe betrachten). — Wenn nur einzelne Antigenklümpchen neben dem knopfartigen Bodensatz „n" zu sehen waren, so habe ich sie mit „$\underset{..}{n}$" bezeichnet.

Nicht immer ist eine gesetzmäßige Form des Bodensatzes in der Titerzone zu sehen, also 3, $\bar{3}$, $\bar{2}$, $\bar{1}$, n, sondern es können auch Uebergänge anderer Art in den Agglutinationsreihen vorkommen, z. B.: 2, $\bar{\bar{3}}$, $\bar{1}$, $\bar{1}$, n; 2, $\bar{2}$, $\bar{3}$, $\bar{1}$, n usw. Die Masse der verklumpten Antigenbakterien auf dem Boden ist hier wichtig, welche bei breiter Verteilung dünner sein muß und bei beschränkter Verbreitung dicker. Also im ersten Falle hätte man $\underline{3}$, im zweiten Falle z. B. 2. Selten kann auch knopfartiger Bodensatz in der positiven Zone vorkommen, wo er aber unbeweglich ist. In der Titerzone tritt er regelmäßig auf, rechts in dieser Zone ist er unbeweglich, nach rechts vergrößert sich die Beweglichkeit fortwährend.

So genaues Aufzeichnen der Agglutinationsphänomene ist nur in besonders wichtigen Fällen und bei wissenschaftlichen Arbeiten notwendig.

Beim Ablesen einer Agglutinationsreaktion stellen wir zuerst fest, ob ein Sediment vorhanden ist. Ist letzteres nicht der Fall, so muß abgewartet werden, bis es sich bildet. Haben wir es mit einem makroskopisch sichtbaren knopfartigen Bodensatz zu tun, so müssen wir mit der Lupe feststellen, ob außerdem ein schleierartiges Sediment vorhanden ist, was auf eine totale oder wenigstens partielle Agglutination hinweist. Fehlt ein Schleier und ist nach mehrtägigem Beobachten der knopfartige Bodensatz beweglich, so liegt eine negative Reaktion vor. Bei erwärmten Sera ist der Prozeß verzögert. Bei langdauernder Beobachtung ist die Titerzone oft nur in einem Gläschen der Agglutinationsreihe (At_2) makroskopisch zu erkennen. Rechts von diesem Gläschen befindet sich schon das knopfartige Sediment, und nur durch das Beobachten der Beweglichkeit des Bodensatzes ist es möglich, in diesem Gläschen auch noch eine totale oder partielle Agglutination zu bestimmen.

Beweglichkeit des knopfartigen Bodensatzes.

Um positive und negative Agglutinationen voneinander genauer zu unterscheiden, habe ich ein neues Merkmal: die Beweglichkeit des Bodensatzes in die Untersuchung einbezogen.

Eine positive Agglutination weist einen verklumpten unbeweglichen Bodensatz auf. Wenn man die Agglutinationsgläschen um ca. 45° zur Unterlage geneigt aufstellt, und sie in diesem Zustande ca. 2—10 Min. stehen läßt, so hat sich die Stellung des Bodensatzes auf dem Boden des Agglutinationsgläschen nicht geändert, oder er ist in seltenen Fällen als ganzer Haufen nur zur Seite verschoben oder gefaltet.

Bei einer negativen Agglutination (also auch einer Testflüssigkeit ohne Serum) ist der Bodensatz knopfartig und beweglich. Stellt man die Stative mit den Agglutinationsgläschen, wie oben, geneigt auf, so kann man nach ca. 2—10 Min. konstatieren, daß der knopfartige Bodensatz zur Seite verschoben ist, wobei meist auch der zurückgelegte Weg durch einen homogenen Antigenstreifen angedeutet wird.

Die ganze Masse der Antigenbakterien am Boden ist beweglich wie trockner Sand beim Neigen des ihn enthaltenden Gefäßes. Eine partielle Agglutination in der Titerzone weist bei Bang-, Malleus-, Pullorumantigen usw.

einen partiell beweglichen Bodensatz auf. Ein Teil der knopfartig sedimentierten Antigenbakterien ist verklumpt und unbeweglich, der andere Teil aber beweglich, wobei man in % den einen oder anderen Anteil des Bodensatzes aufzeichnen kann. Mit Geißeln versehene Bakterien geben oft weniger gut und weniger deutlich bewegliche Bodensätze bei einer negativen Agglutination (bei Typhus-, Paratyphus-Antigen usw.). Einige Beispiele von Aufzeichnungen der Agglutinationsphänomena der Agglutinationsreihen: a) $3, 3, 3^{10}, \underline{3}^{10}, 2^{30}, \underset{..}{n}, n, n, n$ und b) $3, 3, \dot{3}, \underline{\dot{3}}, \dddot{2}, \underset{..}{n}, n, n, n$ - - -. Die Beweglichkeit des knopfartigen Bodensatzes „n“ kommt nur dann zustande, wenn die Serumantigenverdünnung keinen unspezifischen verklebenden Einfluß auf die Antigenbakterien ausgeübt hat.

Verklumpung der Antigenbakterien bei der positiven Agglutination.

Die Verklumpung der Antigenbakterien ist ein Hauptmerkmal der Agglutination. Auf der linken Seite der positiven Zone der Agglutinationsreihe ist es meist leicht, die Verklumpung der Bakterien mit unbewaffnetem Auge zu beobachten. In den Gläschen der positiven Zone nahe der Titergrenze und in der Titerzone ist es meist schwer, dieses Phänomen zu entdecken, oft ist dieses sogar mit der Lupe oder mit Hilfe des Agglutinoskopes nicht möglich, solange die verklumpten Partikelchen in der Flüssigkeit schweben. Leichter ist es, die verklumpten Antigenbakterien zu verfolgen, wenn sie als Sediment zu Boden gesunken sind. Die Beurteilung dessen, ob das Sediment nach dem Schütteln verklumpt oder homogen aussieht, ist makroskopisch sowie mit der Lupe oft erschwert. Die Größe der Klümpchen hängt zum großen Teil von der Stärke des Schüttelns ab, welches in der Praxis schwer zu normieren ist. Deswegen habe ich statt der Bestimmung der Verklumpung die Sedimentanalyse in Anwendung gebracht, d. h. die Beurteilung der Reaktion nach Form und hauptsächlich Unbeweglichkeit des Sedimentes. Letzterer Umstand schließt jedoch die Beachtung der Verklumpungsmerkmale nicht aus.

Hinderung der Bildung unspezifischer Sedimente.

In einem Serum oder einer Serumverdünnung können Sedimente entstehen, die nicht vom Antigen herstammen und makroskopisch betrachtet eine Agglutination vortäuschen. Die verklumpten Teilchen von Serumsubstanz können auch das Antigen beim Sedimentieren mitreißen und so die Illusion einer Agglutination verstärken. In der Laboratoriumspraxis kennen wir kein Verfahren, das schnell und sicher die unspezifische „Agglutination“ von der spezifischen zu unterscheiden ermöglicht. Deswegen ist es sehr wichtig, solchen „Agglutinationsphänomena“ vorzubeugen.

Sie sind meist bakteriellen Ursprungs, verursacht durch die Vermehrung der Bakterien in der Flüssigkeit, wobei die Bakterien entweder selbst die Klümpchen bilden können, oder durch Zersetzung der Serumsubstanzen eine Ausfällung letzterer bewirken. Schließlich könnte die unspezifische Verklumpung noch durch Licht, Enzyme usw. verursacht werden, welche eine Veränderung des Dispersionsgrades der Serumverdünnung hervorrufen können. Um dieser unspezifischen Verklumpung vorzubeugen, muß man folgende Maßnahmen ergreifen: 1. das Serum (das Versuchsmaterial) ist möglichst steril zu erhalten und kühl aufzubewahren. 2. Das Serum kann konserviert werden durch 0,5 % Phenol, 0,1—0,5 % Formalin usw. 3. Das Antigen muß

eine konservierte Reinkultur, die Verdünnungsflussigkeit steril und mit Konservierungsmitteln versehen sein. 4. Die Agglutinationsgläschen und Pipetten müssen steril sein und steril gefullt werden. 5. Die gefullten Gläschen sind vor Staub und möglichst auch vor Licht zu schützen, indem man sie mit Papier bedeckt oder in einen Schrank stellt.

Oben erwähnte Maßnahmen genugen meistens, um bei normalem Material Flocken- und Sedimentbildung zu verhindern, wahrend das bei pathologischem Material oder sehr unreinen Blutproben oft nicht der Fall ist. Hier wäre ein Zentrifugieren des Materials vor dem Fullen der Gläschen anzuraten. Eine Kontrolle der unspezifischen Sedimentbildung kann man folgenderweise durchführen. Man stellt zu einer Agglutinationsversuchsreihe eine parallele Reihe mit demselben Serum bei im übrigen gleichen Bedingungen, nur ohne Antigen auf. Wenn in der Kontrollreihe ein Sediment auftritt, so haben wir es mit unspezifischem Bodensatz zu tun. Ein längeres Stehen bei höherer Temperatur begünstigt das Entstehen von unspezifischem Bodensatz.

Das Kontrollieren der Richtigkeit des Agglutinationswertes.

Beim Kontrollieren der Richtigkeit des Agglutinationswertes ist das Hauptgewicht darauf zu legen, daß

1. die Agglutinationsreaktion normal verlaufen ist. Letzteres kann man beurteilen, wenn man die Agglutinationsreihe verfolgt. Wenn links die positive Zone, rechts davon die Titerzone und weiter rechts die negative Zone der Reihe deutlich zu bemerken sind, so ist das ein wichtiger Beweis dafür, daß die Reaktion normal fortgeschritten ist. 2. Danach ist es notwendig, das Agglutinationsgefälle daraufhin zu kontrollieren, ob der agglutinierte Anteil des Antigens in normalen Verhältnissen von rechts nach links abnimmt. Nur normal verlaufende Reaktionen sind zu berücksichtigen. 3. Es muß ermittelt werden, ob der Agglutinationswert nach seiner Höhe richtig abgelesen ist. Dazu benutzt man die aufgezeichneten Daten über die Agglutinationsphänomene der Agglutinationsreihe und bestimmt die Beweglichkeit der knopfartigen Sedimente der Titerzone und negativen Zone. 4. Eine Kontrolle des Agglutinationswertes ist auch nach dem Agglutinationswert der negativen Zone der Agglutinationsreihe möglich. Wie früher erwähnt, werden vom Anfang der negativen Zone beginnend einige Gläser nach links gezählt und ungefähr das Titerglas ermittelt, wo eine Agglutination zustande gekommen sein kann. Ein so erhaltener Titer muß als maximaler angesehen werden. Dieses Kontrollverfahren ist von Nutzen in Fällen, wo in der Titerzone die Agglutinationsresultate wegen der Opaleszenz der Verdünnungen usw. nicht deutlich auftreten. Spontanagglutination kann kontrolliert werden auch durch die Agglutinationsphänomene der negativen Zone und die Agglutinierbarkeit der Antigenbakterien durch die Phänomene der positiven Zone.

Paradoxe Agglutination.

Man nennt eine Agglutination paradox, wenn in der linken Seite der Agglutinationsreihe keine Agglutination auftritt, wohl aber rechts von ihr. Wenn nur niedrige Verdünnungen vorhanden sind, können solche Erscheinungen Anlaß geben zu unrichtigem Ablesen des Agglutinationswertes und zu Fehldiagnosen. Deshalb muß man diese Möglichkeit in Betracht ziehen. Das Zustandekommen einer paradoxen Agglutination könnte verschiedene Ursachen haben. Meist wird man es wohl mit Hemmungserscheinungen im Bereiche niederer Verdünnungen zu tun haben. Man kann sich vorstellen, daß die niederen Verdünnungen des Serums gegen schnelle Verklumpung

und Sedimentierung der Bakterien, wie Friesen (13) bei der Milch beobachtet hat, Widerstand leisten, so daß eine Verspätung des Phänomens eintreten muß. Eine paradoxe Agglutination kann bei zu frühem Ablesen der Agglutinationsreaktion vorgetäuscht werden, wenn die Reaktion noch nicht in allen Gläsern abgelaufen ist. Ferner konnen Fehler beim Abmessen des Antigens oder des Serums ebenfalls eine Ursache sein. Ebenso kann eine unspezifische Sedimentbildung z. B. unter Einwirkung von Bakterien usw. in den Gläschen der rechten Seite der Agglutinationsreihe oder eine Sedimentierung von Serumbestandteilen eine Agglutination vortäuschen. Schließlich kann eine Agglutination vorgetäuscht werden, wenn das Sediment auf der linken Seite der Agglutinationsreihe knopfförmig ist und man sich beim Ablesen der Reaktion mehr von der Form des Sedimentes, als von der Klarheit der obenstehenden Flüssigkeit leiten läßt und dabei die Unbeweglichkeit des Bodensatzes nicht berücksichtigt.

Die paradoxe Agglutination tritt oft bei erwärmten Sera auf. Fehlern, die im Falle einer paradoxen Agglutination auftreten, kann man folgenderweise vorbeugen: 1. durch eine genügend lange Ablesungszeit (mehrere Tage), damit die Antigenbakterien sich sedimentieren können; 2. durch Analyse des Sedimentes auf seine Beweglichkeit hin; 3. bei hochwertigen Sera und kurzer Ablesungszeit durch die Herstellung langer Agglutinationsreihen etwa von 1 : 25 bis 1 : 800. In diesem Falle kann bei großen Verdünnungen die Agglutination zustande kommen.

Die Bedeutung der Temperatur.

Höhere Temperaturen sind nur soweit erforderlich, als es für das schnelle Zustandekommen der Agglutination unbedingt notwendig ist (einige bis 24 Std. bei 37° C oder höher). Danach müssen die Agglutinationsgläschen bei einer Temperatur stehen, die keine unspezifische Flockenbildung fordert (15° bis 0° C). Falls einige Serumverdünnungen kein langdauerndes Stehen bei 37° C, oder höher vertragen und unspezifische Flocken bilden, so ist das Stehen bei 37° C usw. auf einige Stunden zu verkürzen und sind die Gläser danach kühl aufzubewahren. In solchen Fällen ist es zuweilen ratsam, 37° C überhaupt nicht anzuwenden, wohl aber eine Temperatur von ca. 0° C.

Es ist mir nicht gelungen, durch Gefrieren und sofortiges Auftauen der Bang-Proben die Agglutinationsreaktion schnell hervorzurufen, so wie man nach Asakawa (1) erwarten könnte.

Die Größe der Durchmesser der Agglutinationsgläschen.

Bei breiten Gläsern kann man mit größeren Flüssigkeitsmengen arbeiten, wobei die Meßfehler kleiner werden. Auch wird dabei die Sedimentbildung in einem kürzeren Zeitabschnitt zum Abschluß gelangen, weil die Flüssigkeitssäule niedriger ist als in schmalen Gläschen. Die Beurteilung der Reaktion wird aber schwieriger, weil der Bodensatz in dünnerer Schicht auf eine größere Fläche verteilt nicht so gut sichtbar ist. Deswegen ist es oft zweckmäßig, bei breiten Gläsern dichteres Antigen anzuwenden. Doch werden im letzteren Falle kleinere Nuancen der Titer nicht mehr so leicht erfaßt.

Wann ist das absolute Verfahren anzuwenden?

Das absolute Verfahren der Agglutinationsreaktion soll eine wissenschaftlich exakt arbeitende Methode sein. Es ist umständlicher als das gewöhnliche Verfahren, hauptsächlich durch die länger dauernde Beobachtungszeit. Deswegen ist es nur in den Fällen anzuwenden, wo die Titerhöhe sehr

exakt ermittelt werden soll, oder wenn die Agglutinationswerte miteinander verglichen werden müssen. Bei der Diagnose ist es nur bei sehr exakten Titerbestimmungen notwendig, z. B. bei latenter Infektion, oder wenn der Titer nahe dem Grenzwert liegt, oder bei ungünstigen agglutininhaltigen Flüssigkeiten usw. Die Prinzipien des absoluten Verfahrens können außerdem — auch bei kürzerer Ablesezeit — das exakte Arbeiten erleichtern, unser Kritikvermögen gegen die Agglutinationsreaktion verschärfen und in zweifelhaften Fällen eine Kontrolle der Reaktion ermöglichen.

Zusammenfassung.

1) Es ist zweckmäßig, die Begriffe der Zonen in der Agglutinationsreihe und des Agglutinationsgefälles in der Titerzone zu gebrauchen, da hierdurch die Beurteilung der Agglutinationsreaktion erleichtert wird.

2) Es ist zweckmäßig, den Begriff des Titers der negativen Zone der Agglutinationsreihe einzuführen und diesen nötigenfalls anzuwenden, wenn Hemmungsphänomene in der positiven oder Titerzone in Erscheinung treten.

3) Der Agglutinationswert ist abhängig von der Dauer der Beobachtungszeit; deswegen ist es nicht immer ratsam, ein Ablesen schon nach 24 Std. oder früher vorzunehmen.

4) Die angewandte Temperatur hat keinen entscheidenden Einfluß auf den endgültigen Agglutinationswert.

5) Die höheren Temperaturen 37°—55° C befördern meist das Hervortreten der Agglutinationsphänomene in der positiven und Titerzone, und sie sind anzuwenden in Fällen, wo sie keinen unspezifischen Bodensatz der Serumantigenverdünnung hervorrufen.

6) Der Agglutinationswert hängt von der Dichte des Antigens ab: zweimal dichteres Antigen gibt zweimal niedrigeren Titer usw. und umgekehrt.

7) Der Agglutinationswert eines Serums kann nicht durch die betreffende Verdünnung allein ausgedrückt werden, wohl aber durch diese + Antigendichte bei genügend langer Beobachtungsdauer.

8) Der Agglutiningehalt des Serums kann ausgedrückt werden auch durch die agglutinierte Antigenmenge oder durch die Anzahl der agglutinierten Bakterien, besser durch den Agglutinationswert × Antigendichte.

9) Die Agglutinationswerte verschiedener Forscher können miteinander verglichen werden auf Grund von Punkt 7 und 8.

10) Bang-Stämme haben praktisch meist konstante Agglutinationseigenschaft, doch sind Ausnahmefälle mit abweichender Eigenschaft möglich, letztere Stämme sind besser von der Antigenbereitung auszuschalten.

11) Es ist zweckmäßig, einen jeden Bang-Rasen auf seine Reinheit und Agglutinabilität zu prüfen, bevor man ihn verwendet.

12) Es ist wünschenswert, die Standardisierung des Antigens in der endgültigen Antigenverdünnung zu kontrollieren.

13) Bang-Antigene aus Agarkulturen, die mindestens 4 Monate gestanden haben, ermöglichen, einen praktisch genügend exakten Titer zu erhalten.

14) Vor mindestens 3 Jahren bereitetes Antigen kann ebensogut arbeiten wie frisch hergestelltes.

15) Es ist zu vermeiden, daß Agarsubstanz in das Antigen hineingelangt.

16) Lebende, erwärmte (bei 60° C) und konservierte Brucella-Antigene haben gleiche Agglutinationswerte ergeben.

17) Es ist zweckmäßig, den Begriff der Beweglichkeit des knopfartigen Bodensatzes einzuführen.

18) Die Bildung der unspezifischen Sedimente muß verhindert werden durch geeignete Temperatur, Konservierungsmittel und steriles Arbeiten mit sterilen Flüssigkeiten.

19) Breite Agglutinationsgläser oder geringere Mengen von Agglutinationsflüssigkeit ermöglichen schnellere Sedimentbildung bei der Agglutinationsprobe.

20) Es ist ratsam, das „absolute Verfahren" in bestimmten Fällen der Diagnose und bei exakten wissenschaftlichen Arbeiten anzuwenden.

Schrifttum.

1) Asakawa, Z. Hyg. **45**, 93 (1903). — 2) Bongert, J., Bakteriologische Diagnostik. 1927, 432. — 3) Castellani, A., Z. Hyg. **40**, 1 (1902). — 4) Eisenberg, P., Zbl. Bakter. I Orig. **41**, 96 (1906). — 5) Eisenberg, P., u. Volk, R., Z. Hyg. **40**, 155 (1902). — 6) Eisler, M., u. Silberstein, F., Z. Hyg. **93**, 267 (1921). — 7) Diernhofer, K., Wien. tierärztl. Mschr. 20. Jg., H. 4. — 8) Diernhofer, K., Z. Inf.krkh. Haustiere **49**, 146 (1936). — 9) Detre, L., Z. Immun.forschg **51**, 205 (1927). — 10) Donham, Fich, C., J. amer. vet. med. Assoc. **87**, 188 (1935). Ref. Jber. Vet. med. **59**, 254 (1936). — 11) Fitch, Thompson, Cornell Veterinarian **26**, 222 (1936). Ref. Jber. Vet. med. **61**, 234 (1936). — 12) Frei, Bull. mens. Off. internat. Epizooties **14**, 20 (1937). — 13) Friesen, A., Beitrag zum Nachweis der Bang-Bakterien in der Milch. Diss. Berlin, 1937. — 14) Frohner, Zwick, Seuchenlehre. 1925, 787. — 15) v. Gutfeld, F., Med. Klin. **1922**, 1153. Ref. Zbl. Bakter. Ref. **75**, 57 (1923/24). — 16) Hefferan, M., Zbl. Bakter. I Orig. **41**, 553 (1906). — 17) Heim, L., Lehrbuch der Bakteriologie. 1922, 309. — 18) Hendricsson, E., Epizoot. Abortus und Undulantfieber. Stockholm 1932. — 19) Heuer, G., Z. Hyg. **95**, 100 (1922). — 20) von Hoeden, J., Z. Inf.krkh. Haustiere **42**, 1 (1932). — 21) Hutyra u. Marek, Spez. Pathologie und Therapie 822 (1922). — 22) Joos, A., Z. Hyg. **40**, 203 (1902). — 23) Kamada, K., Zbl. Bakter. I Orig. **120**, 364 (1931). — 24) Kirstein, F., Z. Hyg. **46**, 229 (1904). — 25) Klimmer, M., Technik und Methodik der Bakteriologie u. Serologie 1923, 39. — 26) Ders., Berl. tierärztl. Wschr. **1932**, 151. — 27) Konrich, F., Z. Hyg. **46**, 261 (1904). — 28) Ders., Zbl. Bakter. I Orig. **48**, 92 (1909). — 29) Kraus, Kovacs, Paltauf, Agglutination und Agglutinine. Handb. d. pathog. Mikroorg., Bd. II, 2. T., S. 987, (1929). — 30) Kristensen, M., Zbl. Bakter. I Orig. **108**, 89 (1928). — 31) Ders., Ebenda **120**, 179 (1931). — 32) Ders., u. Holm, P., Ebenda **112**, 281 (1929). — 33) Laun, R. H., u. Heide, E., Z. Hyg. **116**, 315 (1934/35). — 34) Lehmann, K., u. Neumann, R., Allgemeine und spezielle Bakteriologie, Bd. II, 159, (1927). — 35) Lentz, W., Dtsch. tierarztl. Wschr. **1926**, 557. — 36) Lerche, M., Z. Inf.krkh. Haustiere **38**, 253 (1931). — 37) Lübke, A., Arch. Tierheilk. **67**, 436 (1934). — 38) Mellick, C. O., J. med. Res. **43**, 405 (1922). Ref. Zbl. Bakter. Ref. **75**, 346 (1923/24). — 39) Messerschmidt, Th., Die Agglutination. Handb. d. biolog. Arbeitsmethoden, Abt. 13, T. 2, 155, (1933). — 40) Meyn, Ref. v. Mießner, te Hennepe, Berge, Schütt. Dtsch. tierärztl. Wschr. **1932**, 33. — 41) Mießner, H., u. Schütt, G., Dtsch-tierärztl. Wschr. **1932**, 497. — 42) Mießner, H., Ref. Mießner u. Harms, Bekämpfung der Aufzuchtkrankheiten, 199. Hannover 1937. — 43) Minelli, S., Zbl. Bakter. I Orig. **41**, 583 (1906). — 44) Noblat, Observations sur le Mécanisme de l'Agglutination. Diss. Nancy 1929. — 45) Pollaci, G., Zbl. Bakter. I Orig. **52**, 108 (1909). — 46) Poppe, K., Der infektiose Abortus des Rindes (Bang-Infektion). Handb. d. pathog. Mikroorg., Bd, 6, T. II, 693, 1929. — 47) Porges, O., u. Prantschoff, A., Zbl. Bakter. I Orig. **41**, 466 (1906). — 48) Quinlan, J., Arch. Tierheilk. **49**, 193 (1923). — 49) Reeser, H. E., Ref. Dtsch. tierärztl. Wschr. **1922**, 644. Mededeelingen von de Rijksseruminrichting, Deel II, Afl. III, 172. — 50) Reichsgesundheitsblatt, Vorschläge zur einheitlichen serologischen Feststellung der Bang-Bakterieninfektion des Rindes **1935**, 247. — 51) Reinhardt, R., u. Gauß, Z. Inf.krkh. Haustiere **16**, 219 (1914/15). — 52) Schultehinrichs, J., Ueber den Nachweis von Abortus-Bang-Agglutininen in der Milch mit besonderer Berücksichtigung der für die amtliche Milchuntersuchung brauchbaren Methoden. Diss. Hannover, 1937. — 53) Schumann, Dtsch. tierärztl. Wschr. **1926**, 44. — 54) Ders., Ebenda **1928**, 697. — 55) Schwarz, M., Z. Fleisch- u. Milchhyg., 39. Jg., 175 (1929). — 56) Stableforth, A.,

Bull. mens. Off. internat. Epizooties **12**, 107 (1936). — 57) Ders., J. comp. Path. a. Ther. **49**, 251 (1936). Ref. Jber.Vet. med. **61**, 235 (1937). — 58) Ders., Vet. Rec. **1937**, 1298. Ref. Jber. Vet.med. **62**, 508 (1938). — 59) Stockmayer, W., Ueber die Serodiagnose der Brucellose. Ref. v. Mießner u. Harms, Bekämpfung der Aufzuchtkrankheiten, 912. Hannover 1937. — 60) Summa, H., Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis von Bakterium-Abortus-Bang in Milch. Diss. Gießen 1934. — 61) Thompson, A., Die Brucellose des Schweines. Ref. v. Mießner u. Harms in: Bekämpfung der Aufzuchtkrankheiten, 172. Hannover 1937. — 62) Topley, W. W. C., a. Wilson, G. S., The principles of Bacteriologie and Immunity, I, 152 (1927). — 63) Traum, J., a. Henry, B., Cornell Veterinarian XIX, 105, Ref. Dtsch. tierarztl. Wschr. **1929**, 602. — 64) Uwarow, W. G., Weterinarnaja mikrobiologia, Moskwa 1934. — 65) Vellisto, E., Einiges uber den Milchagglutinationstiter bei der Bang-Infektion der Kühe. Eesti Loomaarstlik Ringvaade **1935**, 15. — 66) Ders., „Agglutinationsreihe", „Zonen (Abschnitte) der Agglutinationsreihe", „Agglutinationsgefalle der Titerzone". Eesti Loomaarstlik Ringv. **1938**, 150. — 67) Ders., Wie ändert sich der Agglutinationswert im Zusammenhange mit der Dauer der Beobachtungszeit? Eesti Loomaarstl. Ringv. **1938**, 169. — 68) Ders., Einiges über den Einfluß der Wärme auf die Agglutinationsreaktion. Eesti Loomaarstl. Ringv. **1938**, 201. — 69) Walker, E. W. A., Proc. roy. Soc., series B, **93**, 54 (1922). Ref. Zbl. Bakter. Ref. **75**, 57 (1923/24). — 70) Wall, S., Z. Inf.krkh. Haustiere **10**, 23 (1911). — 71) Ders., Skand. Vet. Tidskr. **1936**, 413. — 72) Willems, R., Bull. mens. Off. internat. Epizooties **14**, 62 (1937). Ref. Jber. Vet.-med. **63**, 167 (1938). — 73) Winkler, Ueber die Ausscheidung des Bacillus abortus Bang mit der Milch. Diss. Leipzig, 1919. — 74) Witte, Ref. von Mießner u. Harms, in: Bekämpfung der Aufzuchtkrankheiten, 202. Hannover 1937. — 75) Wyschelessky, Brucelljos s.-h. schiwotnych. Moskwa 1934.

[Aus dem Bakteriologischen Institut des Allgemeinen Krankenhauses Hamburg-Altona (Prof. Dr. Zeissler).]

Kann durch Kochen in Zephirol- bzw. Quartamon-Lösungen sterilisiert werden?

Von **J. Zeissler** und **O. Günther.**

Brekenfeld und Kayser empfehlen auf Grund sehr ausgedehnter eigener Versuche zur Sterilisation chirurgischer Instrumente viertelstündiges Kochen in 0,75proz. bzw. 2proz. Zephirollösung. Bis jetzt konnten Instrumente nicht durch einfaches Kochen bei 100°, sondern nur durch Behandlung mittels gespannten Dampfes in hierfür besonders konstruierten Instrumentensterilisatoren oder auch in Autoklaven sterilisiert werden. Für den praktischen Arzt und ebenso für den Militärarzt im Felde würde die Entbehrlichkeit besonderer Instrumentensterilisatoren bzw. Autoklaven gar nicht hoch genug bewertet werden können. Die Vorschläge Brekenfelds und Kaysers verdienen stärkste Beachtung, weil sie eine der größten Kalamitäten in der Chirurgie des praktischen Arztes und in der Feldchirurgie des Militärarztes auf einfachste Weise zu beheben versprechen. Die überaus große praktische Bedeutung der Vorschläge Brekenfelds und Kaysers verlangt jedoch vor ihrer allgemeinen Einführung eine sehr strenge, jeden irgendwie möglichen sachlichen oder logischen Fehler sicher ausschließende Nachprüfung, ehe die jetzt gültigen scharfen Anforderungen an die Sterilisation chirurgischer Instrumente zu-

gunsten eines neuen, wenn auch noch so einfachen Verfahrens aufgegeben werden können.

Als Testobjekt benutzten die Autoren mit Recht sporenhaltige Gartenerde. Allerdings Gartenerde mit nur 12stündiger Kochresistenz der Sporen. Solche Erde genügt hierfür nicht. Konrich verlangt für Sterilisationsprüfungen Erde mit wenigstens 20stündiger Kochresistenz der Sporen. Das von Brekenfeld und Kayser zu ihren Sterilisationsversuchen benutzte Testobjekt genügt also qualitativ nicht den nach den autoritativen Feststellungen Konrichs heute an ein Testobjekt für Sterilisationsprüfungen zu stellenden Ansprüchen.

Ihre sporenhaltige Erde klebten Brekenfeld und Kayser mittels eiweißhaltiger Medien (Blut bzw. Eiter) an die chirurgischen Instrumente an und ließen sie daran festtrocknen. Vor dem Kochen in den Zephirollösungen „wurden mit einer gewöhnlichen Bürste die nach obiger Beschreibung vorbehandelten Instrumente in der der Versuchsreihe entsprechenden zimmerwarmen Lösung mechanisch gereinigt, bis rein äußerlich kein Schmutz mehr zu sehen war, also vom Laienstandpunkt die Instrumente als ‚sauber' angesehen werden konnten“. Diese bis zur „Sauberkeit“ getriebene mechanische Reinigung der Instrumente ist nicht in Einklang zu bringen mit Konrichs Forderung, daß bei Sterilisationsprüfungen für jede Einzelprobe 1—2 g, wenigstens aber 1 g der sporenhaltigen Testerde in die Kultur kommen muß zur Sicherung des Vorhandenseins einer genügend großen Zahl hochresistenter Bazillensporen. Das von Brekenfeld und Kayser zu ihren Sterilisationsversuchen benutzte Testobjekt genügt also auch quantitativ nicht den nach den autoritativen Feststellungen Konrichs heute an ein Testobjekt für Sterilisationsprüfungen zu stellenden Ansprüchen.

Bei Sterilisationsprüfungen mit Chemikalien verlangt ein etwaiges Verbleiben des Chemikales im oder am Testobjekt nach Abschluß des Sterilisationsaktes und sein Hineingelangen in die Kultur sorgfältigste Berücksichtigung. Denn hier in der Kultur können Reste des Chemikales — soweit es nicht chemisch neutralisiert oder auf anderem Wege entfernt werden konnte — durch Entwicklungshemmung eine durch das zu prüfende Sterilisationsverfahren de facto nicht erreichte Sterilität vortäuschen. Brekenfeld und Kayser berichten über keinen irgendwie gearteten Versuch zur Neutralisation oder sonstigen Entfernung des Zephirols von ihrem Testobjekt. Auch die Zusammensetzung ihrer Kulturnährböden läßt keinen Versuch zum Abfangen der wachstumsstörenden Zephirolreste in ihren Kulturen erkennen. Es muß deshalb bei den Sterilisationsversuchen Brekenfelds und Kaysers mit der Vortäuschung einer durch den Sterilisationsakt de facto nicht erreichten Sterilität durch Wachstumshemmung in den zephirolhaltigen Kulturen gerechnet werden.

Jede einzelne der drei hier gegen die Arbeitsweise Brekenfelds und Kaysers gemachten Ausstellungen: die unzulängliche Qualität der von ihnen benutzten Testerde (nur 12stündige Kochresistenz der Sporen), die zu geringe Menge derselben (kaum sichtbare Spuren statt wenigstens 1 g), die Möglichkeit der Wachstumshemmung in den Kulturen durch Zephirolreste, reicht für sich allein aus, das Ergebnis der Brekenfeldschen und Kayserschen Instrumentensterilisationsversuche durch Kochen in Zephirollösung in Frage zu stellen.

Unter Vermeidung der vorstehend aufgezählten Bedenken haben wir in der in Anlage I dargestellten Arbeitsweise die Möglichkeit der Abtötung genuiner Erdsporen durch einfaches Kochen in Zephirol-Lösungen und daneben zum Vergleich auch in Lösungen von Quartamon geprüft.

Anlage 1.

Versuchsnummer		Versuchsanordnung	Züchtung	Ergebnis der Züchtung nach 1 Tag	2 Tagen	3 Tagen	4—5 Tagen	Endergebnis
		Zephirol						
	Z 1	In 10 250-ccm-Soxhletkolben je 1,5 g „Gartenerde Konrich“ in 150 ccm 10proz. Zephirollösung 15 Min. gekocht. Dann die Zephirollösung durch 150 ccm einpromillige Kalilauge ersetzt. Eine Stunde später Kalilauge abgegossen und Gartenerdebodensatz dreimal mit je 150 ccm physiologischer Kochsalzlösung gewaschen [2]).	**Aerob** mit je 150 ccm frischbereiteter steriler, einfacher Nährbouillon bei 37°.	—	—	—	—	Nach 30 Tagen kein Wachstum.
Kontrollen	Z 1a	Ein Soxhletkolben, wie Z 1 behandelt, dann erneut mit 1,5 g „Gartenerde Konrich“ beimpft. (Kontrolle auf Wachstumshemmung durch Zephirolreste.)	Aerob wie oben.	Leichte Trübung	Starke Trübung	Starke Trübung u. Kahmhaut		
	Z 1b	1,5 g „Gartenerde Konrich“, ohne Zephirol und ohne Kochen.	dgl.	Starke Trübung u. Kahmhaut		Intensive Schwärzung		
	Z 1c	1,5 g „Gartenerde Konrich“ ohne Zephirol in 150 ccm Aqua dest. 15 Min. gekocht, dann mit Kalilauge und Waschungen behandelt wie Z 1. (Kontrolle der Kalilaugenwirkung [2]).	dgl.					
	Z 2	In 10 200-ccm-Erlenmeyerkolben wie Z 1.	**Anaerob** mit je 150 ccm frischbereiteter Leberbouillon im Anaerobenapparat bei 37°.	In einem Kolben Gasblasen	—	— / Trübung u. Gasblasen	In allen 10 Kolben Trübung u. Gasblasen	Aus 4 Kolben Bacillus mesentericus allein, aus 3 Kolben ein dem Tetanusbazillus ähnlicher, apathogener, obligat anaerober Bazillus und der Bacillus mesentericus, aus 3 Kolben der Tetanusbazillus und der Bacillus mesentericus [1]).
Kontrollen	Z 2a	Ein Erlenmeyerkolben, behandelt wie Z 2, dann erneut mit 1,5 g „Gartenerde Konrich“ beimpft. (Kontrolle auf Wachstumhemmung durch Zephirolreste.)	dgl.	Trübung und Gasblasen				
	Z 2b	5 unbeimpfte Erlenmeyerkolben (Nährbodenkontrolle.)	dgl.	—	—	—	—	Nach 30 Tagen kein Wachstum.
	Z 3	In 5 Erlenmeyerkolben je 1,5 g „Gartenerde Konrich“ in je 150 ccm 20proz. Zephirollösung 15 Min. gekocht und weiterbehandelt wie Z 1.	dgl.	—	—	—	In allen 5 Kolben Trübung und Gasblasen	Aus allen 5 Kolben Bacillus mesentericus, aus 2 Kolben außerdem ein anderer aerober Bazillus [1])
Kontrollen	Z 3a	Ein Erlenmeyerkolben, behandelt wie Z 3, dann erneut mit 1,5 g „Gartenerde Konrich“ beimpft. (Kontrolle auf Wachstumhemmung durch Zephirolreste.)	dgl.	Trübung und Gasblasen				
	Z 3b	3 unbeimpfte Erlenmeyerkolben (Nährbodenkontrolle).	dgl.	—	—	—	—	Nach 30 Tagen kein Wachstum.

		Quartamon						
Q 1		In 10 250-ccm-Soxhletkolben je 1,5 g „Gartenerde Konrich“ in 150 ccm 10proz. Quartamonlösung 15 Min. gekocht. Dann die Quartamonlösung durch 150 ccm 40—50° warme physiologische Kochsalzlösung ersetzt. Eine Stunde später der Gartenerdebodensatz noch dreimal mit je 150 ccm warmer Kochsalzlösung gewaschen [3]).	**Aerob** mit 150 ccm frischbereiteter steriler einfacher Nährbouillon bei 37°	—	—	—	—	Nach 30 Tagen kein Wachstum.
Kontrollen	Q 1a	Ein Soxhletkolben, wie Q 1 behandelt, dann erneut mit 1,5 g „Gartenerde Konrich“ beimpft. (Kontrolle auf Wachstumhemmung durch Quartamonreste.)	dgl.	Leichte Trübung	Starke Trübung	Starke Trübung u. Kahmhaut		
Kontrollen	Q 1b	1,5 g „Gartenerde Konrich“, ohne Quartamon und ohne Kochen.	dgl.	Starke Trübung und Kahmhaut	—	Intensive Schwärzung		
Q 2		In 10 200-ccm-Erlenmeyerkolben, wie Q 1.	**Anaerob** mit 150 ccm frischbereiteter steriler Leberbouillon im Anaerobenapparat bei 37°	—	—	In 6 Kolben Trübung und Gasblasen	In allen 10 Kolben Trübung und Gasblasen	Aus allen 10 Kolben der Bacillus mesentericus, aus einem Kolben außerdem ein dem Tetanusbazillus ähnlicher, apathogener, obligat anaerober Baz.[1]).
Kontrollen	Q 2a	Ein Erlenmeyerkolben, behandelt wie Q 2, dann erneut mit 1,5 g „Gartenerde Konrich“ beimpft. (Kontrolle auf Wachstumhemmung durch Quartamonreste.)	dgl.	Trübung und Gasblasen				
Kontrollen	Q 2b	3 unbeimpfte Erlenmeyerkolben (Nährbodenkontrolle).	dgl.	—	—	—	—	Nach 30 Tagen kein Wachstum.
Q 3		In 5 Erlenmeyerkolben je 1,5 g „Gartenerde Konrich“ in je 150 ccm 20proz. Quartamonlösung 15 Min. gekocht und weiterbehandelt wie Q 1.	dgl.	—	—	—	In allen 5 Kolben Trübung und Gasblasen	Aus allen 5 Kolben der Bacillus mesentericus, aus 3 Kolben außerdem ein anderer aerober Bazillus[1]).
Kontrollen	Q 3a	Ein Erlenmeyerkolben, behandelt wie Q 3, dann erneut mit 1,5 g „Gartenerde Konrich“ beimpft. (Kontrolle auf Wachstumhemmung durch Quartamonreste.)	dgl.	Trübung und Gasblasen				
Kontrollen	Q 3b	3 unbeimpfte Erlenmeyerkolben (Nährbodenkontrolle).	dgl.	—	—	—	—	Nach 30 Tagen kein Wachstum.

1) Die gezüchtete Keimflora ist nicht das Ergebnis einer erschöpfenden bakteriologischen Analyse, sondern nach 8tägiger anaerober Bebrütung der Kolben durch einmaliges Ausstreichen auf aerobe und anaerobe Platten gewonnen.

2) Nach Mitteilung der Herstellungsfirma I.G.Farben soll die Wirksamkeit des Zephirols bei alkalischer Reaktion erheblich niedriger sein als bei saurer Reaktion.

3) Nach Mitteilung der Herstellungsfirma Schülke u. Mayr, Hamburg, soll Quartamon bei saurer und alkalischer Reaktion die gleiche Wirksamkeit besitzen. Warme Waschlösungen sollen das Auswaschen des Quartamons erleichtern.

Im Gegensatz zu Brekenfeld und Kayser haben wir nicht 0,75- bzw. 2proz., sondern 10- und 20proz. Zephirol- bzw. Quartamon-Lösungen benutzt.

Als Testobjekt diente uns die schon von Konrich seit Jahren zu seinen klassischen Sterilisationsstudien benutzte „Berliner Gartenerde"; hier als „Gartenerde Konrich" bezeichnet, mit mehr als 50stündiger Kochresistenz der Sporen und der in Anlage II aufgeführten Sporenflora. Sie wurde mittels steriler Glastrichter, deren unteres Ende in die in den Kolben vorgelegte Zephirol- bzw. Quartamonlösungen hineinragte, staubfrei in die Lösungen eingefüllt in Menge von je 1,5 g.

Die Prüfungen wurden in zwei Serien ausgeführt, deren Nachkulturen einmal in einfacher Nährbouillon aerob, zum anderen in Leberbouillon im luftverdünnten Raum bei 37° gegebenenfalls bis zu 30 Tagen bebrütet wurden.

Anlage II.

Die Sporenflora der „Gartenerde Konrich".

A. Die Aerobier [1]).

1. Bacillus mesentericus ruber. (Kochresistenz der Natursporen 18 Std.)
2. Bacillus mesentericus. (Kochresistenz der Natursporen 28 Std.)
3. Bacillus X. (Nicht naher bestimmt, Kochresistenz der Natursporen mindestens 50 Std.)
4. Bacillus Y (dessen Eigenschaften aus äußeren Grunden hier nicht naher angegeben werden konnen).

B. Die obligaten Anaerobier [2]).

1. Fränkelscher Gasbazillus (Bacillus Welchii, Bacillus perfringens).
2. Novyscher Bazillus des malignen Oedems (Bac. oedematiens).
3. Bazillus Gigas (Bacillus haemolyticus).
4. Bacillus histolyticus.
5. Bacillus tetani (für Meerschweinchen apathogener Stamm).
6. Bacillus botulinus.
7. Bacillus putrificus verrucosus (Bacillus sporogenes).
8. Bacillus putrificus tenuis (Bacillus bifermentans).
9. Bacillus tertius.
10. Bacillus lichenoides.
11. Ein dem Tetanusbazillus ähnlicher, apathogener, obligat anaerober Bazillus.

---

1) Die aerobe Sporenflora der „Gartenerde Konrich" ist nicht erschopfend analysiert. Die 4 aeroben Bazillenarten unserer Tabelle sind bei Hitzeresistenzprüfungen gezüchtet worden. Wir kochten in 250-ccm-Soxhletkolben je 1,5 g „Gartenerde Konrich" in je 150 ccm Aqua dest. verschieden lange Zeit bis zu 50 Std. im Dampftopf und bebruteten nach Abgießen der Aqua dest. von je 2 Kolben gleicher Erhitzungsdauer den einen mit 150 ccm gewohnlicher Nährbouillon und den anderen mit 150 ccm $^1/_2$proz. Traubenzuckerbouillon aerob bei 37°. Einen Einfluß des Traubenzuckerzusatzes zur Bouillon auf die Entwicklung der den Kochprozeß überlebenden Keime haben wir nicht festgestellt. Aus den bis zu einer Stunde erhitzten Kolben wurde eine bunte Mischflora gezüchtet. Aus den von 2 bis zu 28 Std. erhitzten Kolben wuchs der Bacillus mesentericus, bis zu 18 Std. auch der Bacillus mesentericus ruber. Bei den höheren Erhitzungen bis zu 50 Std. fanden wir in jedem Kolben bei der nachfolgenden Bebrütung schlanke, lange, unbewegliche Stäbchen, die in einfacher Nahrbouillon oder $^1/_2$proz. Traubenzuckerbouillon in 2—3 Tagen eine Trübung, aber auch nach 14tägiger Bebrütung keine Kahmhaut erzeugten. In Gelatine wuchs der Keim kümmerlich ohne Verflüssigung der Gelatine. Auf Agar bildete der Keim kleine, grauweiße, flache und kleine, grauweiße, runde, erhabene Kolonien, auf Blutagarplatten mit einem Zusatz von 2 Proz. Traubenzucker graublaue Rasen und graublaue, runde, erhabene Kolonien. Dieser hochstresistente Keim der „Gartenerde Konrich" wurde in den Erhitzungen bis zu 22 Std. anscheinend von den rascher wachsenden Mesentericusarten überwuchert. Aus den Erhitzungen von 24—28 Std. züchteten wir den höchstresistenten Keim neben dem Bacillus mesentericus.

2) Die Analyse der anaeroben Sporenflora wurde nach der von Zeissler sowie Zeissler und Rassfeld angegebenen Methode durchgeführt. Durch Erhitzungen mit nachfolgender anaerober Bebrütung in Leberbouillon stellten wir fest, daß mit Ausnahme des dem Tetanusbazillus ähnlichen, apathogenen, obligat anaeroben Bazillus mit einer Kochresistenz der Natursporen und Kultursporen von 5 Std. keiner der übrigen 10 aus der „Gartenerde Konrich" gezüchteten obligaten Anaerobier eine Kochzeit von 4 Std. überlebte.

Die Kulturen in Leberbouillon wurden nicht allein zur Gewinnung der den Kochakt etwa überstanden habenden anaeroben Keime angelegt, sondern zugleich auch als Versuch, durch die von uns angewandten Auswaschverfahren (vgl. Anlage I) nicht entfernte Zephirol- bzw. Quartamon-Reste zu binden. Das Ausbleiben jeglichen Bakterienwachstums in allen 20 Kolben der Reihen Z 1 und Q 1 der Anlage I im Gegensatz zum Auswachsen zahlreicher Keime in den Kolben der Reihen Z 2, Z 3, Q 2, Q 3 der Anlage I bestätigt die Richtigkeit dieser Ueberlegung und beweist die Entwicklungshemmung durch Zephirol- bzw. Quartamon-Reste bei Nachkultur in einfacher Nährbouillon, wie sie Brekenfeld und Kayser ausschließlich ausgeführt haben.

Zusammenfassung.

Die in Anlage I wiedergegebene Prüfung lehrt, daß bei Verwendung einer nach Qualität (wenigstens 20stündige Kochresistenz der Sporen) und Quantität (wenigstens 1 g pro Einzelprobe) genügenden sporenhaltigen Testerde und durch Bindung der Zephirol- bzw. Quartamon-Reste in der Nachkultur durch Leberbouillon viertelstündiges Kochen in 10proz. und in 20proz. Zephirol- bzw. Quartamon-Lösungen genuine Erdsporen nicht abtötet.

Viertelstündiges Kochen in 10proz. oder 20proz. Zephirol- bzw. Quartamon-Lösungen ist kein Sterilisationsverfahren.

Schrifttum.

Brekenfeld, Der deutsche Militärarzt **1938**, S. 10. — Kayser, Der Chirurg **1938**, 351. — Konrich, Die bakterielle Keimtotung durch Wärme. Stuttgart, F. Enke, 1938. — Zeissler, Handb. d. pathog. Mikroorg., Kolle-Kraus-Uhlenhuth, 3. Aufl., Bd. 10, S. 35—144. — Zeissler u. Rassfeld, Die anaerobe Sporenflora der europäischen Kriegsschauplätze 1917. Jena, G. Fischer, 1928.

Die Firma Schülke u. Mayr hat von sich aus ihr Quartamon nicht zur Sterilisation chirurgischer Instrumente empfohlen.

Zu der Arbeit von Zeissler und Günther: „Kann durch Kochen in Zephirol- bzw. Quartamon-Lösungen sterilisiert werden?“

in Bd. 144 S. 402 dieser Zeitschrift.

Von Oberstarzt a. D. Dozent Dr. Brekenfeld.

Zu der Abhandlung von Zeissler und Günther ist von Kayser und mir folgendes zu sagen:

1. Es wird eingewendet, daß die von Kayser und mir benutzte Gartenerde nur eine Dampfresistenz von 12 Std. hatte, während Konrich eine solche von 20 Std. verlangt.

Entgegnung: Der Einwand ist dadurch gegenstandslos, daß ich Kontrolluntersuchungen der wie beschrieben verschmutzten Instrumente im Autoklaven bei 120° während 20 Min. angestellt habe, wobei die Instrumente in einem Citocert, also unter günstigsten Bedingungen, lagen. Von 200 Instrumenten konnten an 2 lebensfähige Erdbazillen nachgewiesen werden. Dagegen wurden von 600 Instrumenten, die 15 Min. in 0,75proz. Zephirollösung gekocht waren, nur an 1 lebensfähige Erdbazillen nachgewiesen.

Hieraus geht hervor, daß das Kochen in 0,75proz. Zephirollösung während 15 Min. dem Sterilisieren im Autoklaven bei 120° während 20 Min. zum mindesten nicht nachsteht, bei meinen Versuchen ihm sogar überlegen war. Wenn man also den Aufenthalt von Instrumenten für 15 Min. bei 120°igem Dampf als Sterilisationsmethode bezeichnet, muß man auch alle gleich wirksamen bzw. noch wirksameren als Sterilisationsmethoden gelten lassen, also auch das 15-Minutenkochen in 0,75proz. Zephirollösungen.

2. Es wird beanstandet, daß wir nicht jede Einzelprobe der Verschmutzung (Gartenerde und Blut) in einer Menge von 1—2 g in die Nachkultur gebracht haben.

Entgegnung: Zeissler und Günther übersehen, daß uns ja besonders daran gelegen war, ein Sterilisationsverfahren unter natürlichsten, in der Praxis gegebenen Bedingungen zu finden. Deshalb haben wir, da es so auch in jeder chirurgischen Klinik geschieht, die Instrumente nach der Verschmutzung erst in der üblichen Weise in Sodalösung gebürstet, bis sie äußerlich sauber erschienen. Bei diesem Verfahren bleibt nun einmal keine Verschmutzung in einer Menge von 1—2 g an dem einzelnen Instrument. Vielmehr gehört diese mechanische Reinigung mit dem nachfolgenden Kochen in Zephirollösung sozusagen zum Sterilisationsvorgang.

Es lassen sich praktische Versuche, wie wir sie angestellt haben, nicht durch Laboratoriumsversuche unter ganz anderen Bedingungen widerlegen. Die von uns zur Verschmutzung benutzten Erdsporen waren in Bluteiweiß gehüllt in den für ein Desinfektionsmittel schwer zugänglichen Rillen der Instrumente angetrocknet. Die von Zeissler und Günther benutzte 1,5 g Erde wurde lose in Glaskolben gekocht.

Wir benutzten u. a. 0,75—2proz. Zephirollösungen, Zeissler und Günther dagegen 10—20proz. Es darf darauf hingewiesen werden, daß mit der Stärke der Konzentration die keimtötende Wirkung eines Mittels keineswegs immer steigt.

3. Es wird von Zeissler und Günther der Verdacht ausgesprochen, daß durch die von Kayser und mir gewählte Abimpfmethode Spuren von Zephirol in die Nachkultur hineingelangt sein können und das Wachstum der Keime gehindert haben.

Entgegnung: Es kann sich bei unseren Versuchen nur um so geringe Spuren von Zephirol handeln, daß eine entwicklungshemmende Kraft auf Bakterien von diesen Spuren nicht mehr angenommen werden kann. Das beweisen unsere Versuche mit fallenden Zephirolkonzentrationen. Es wiesen auf:

100 Instrumente beim Kochen in 0,03proz. Zephirollösung 35 Proz.
0,01 „ „ 48 „
Unsterilitäten.

Die Spuren von Zephirol, welche in die Nachkultur gelangt sein können, liegen fraglos noch um ein Vielfaches unter diesen Konzentrationen. Aus diesem Grunde ist auch von vornherein auf entsprechende Kontrollversuche

verzichtet worden, da sie ebenso positiv gewesen wären [1]). Es ist aber auch noch folgendes zu bedenken: Wenn wirklich diese an den Instrumenten noch haftenden Zephirolspuren entwicklungshemmend auf die Keime wirken, so werden sie es auch tun, wenn man bei Operationen die Gewebssäfte des Körpers als Nachkultur annimmt, in die sie auf Grund theoretischer Erwägungen genau so hineingelangen, wie etwa noch an den Instrumenten haftende lebensfähige Keime. Kayser und ich wären von unseren natürlichen Bedingungen abgewichen, wenn wir die Instrumente, wie es kein Chirurg in der Praxis tut, erst von diesen Spuren Zephirol befreit hätten. Es kommt hinzu, daß durch diese Nachbehandlung wie sie Zeißler und Günther. vorgenommen haben, künstliche Verunreinigungsmöglichkeiten geschaffen wurden, die als Fehlerquelle Beachtung verdienen.

Zusammenfassung.

Die von Zeissler und Günther angestellten Versuche sind nach unserem Dafürhalten nicht geeignet, die von Kayser und mir für die Praxis, besonders unter Feldverhältnissen, empfohlene Instrumenten-Sterilisationsmethode zu widerlegen, zumal der 120° gespannte Dampf selbst unter günstigsten Bedingungen (Citocert) nicht in der Lage war, während 20 Min. Einwirkungszeit ein besseres Ergebnis zu erzielen als unsere 0,75—2proz. Zephirollösungen. Gegenüber dem Kochen der Instrumente in Sodalösungen, wie es auch neben der Dampfsterilisation in vielen chirurgischen Kliniken geübt wird und wie es unter Feldverhältnissen bisher allein möglich ist, erscheint das Kochen in 0,75—2proz. Zephirollösungen vielmehr nach unseren Versuchen zur Zeit als Methode der Wahl.

Schlußwort zu den Entgegnungen Brekenfelds auf unsere Arbeit: „Kann durch Kochen in Zephirol- bzw. Quartamon-Lösungen sterilisiert werden?"

Von J. Zeissler und O. Günther.

Zu Brekenfelds Entgegnungen auf unsere Arbeit „Kann durch Kochen in Zephirol- bzw. Quartamon-Lösungen sterilisiert werden?" müssen wir abschließend folgendes bemerken:

1. Der von Brekenfeld als Beleg für ausreichende Dampfresistenz der von ihm als Testobjekt benutzten Erdsporen mitgeteilte Umstand, daß bei einem von ihm angestellten Kontrollversuch von 200 mit dieser Testerde beschmutzten Instrumenten nach 20 Min. langem Autoklavieren bei 120° 2 (zwei) Instrumente nicht keimfrei geworden waren, reicht nicht aus als

1) Nachträglich angestellte Kontrollversuche ergaben, daß eine Platinöse Erdbrei in 0,03- und 0,01proz. Zephirolbouillon nach 48 Stunden starkes Wachstum zeigte.

Beweis für so völlig ungewöhnliche Dampfresistenz seiner Erdsporen. Denn bis jetzt sind keine Bazillensporen bekannt, die länger als 8 (acht) Min. Dampf von 120° zu widerstehen vermögen. Die hier mitgeteilte Beobachtung Brekenfelds muß auf andere Ursachen als auf eine bis jetzt noch nie beobachtete Dampfresistenz der Sporen zurückgeführt werden. Das um so mehr, als die von Brekenfeld beobachtete Keimentwicklung nur in 2 (zwei) von 200 Proben stattgefunden hat. Es sei in diesem Zusammenhang noch daran erinnert, daß Brekenfelds Testerde nach seinen eigenen Angaben nur Sporen sehr viel geringerer Dampfresistenz enthielt (sie vertrugen nur 12stünd. Kochen) als die von uns benutzte „Gartenerde Konrich" (deren Sporen mehr als 50stünd. Kochen vertragen und trotzdem niemals 10 Min. langes Autoklavieren bei 120° ausgehalten haben).

2. Brekenfeld lehnt für das von ihm für die Praxis bestimmte „Sterilisationsverfahren" eine exakte Prüfung im Laboratorium ab, weil solche Laboratoriumsprüfung allzusehr von den Verhältnissen der Praxis abweiche. Dieser Standpunkt könnte vielleicht berechtigt sein, wenn der Begriff der „Sterilisation" nach den jeweiligen Erfordernissen der Praxis verschieden ausgelegt werden könnte. Das ist aber nicht der Fall. Denn für das Gebiet des Deutschen Reiches ist der Begriff der „Sterilisation" im „Arzneibuch für das Deutsche Reich" gesetzlich festgelegt als das „Freimachen eines Gegenstandes von allen Keimen". Ganz ohne Rücksicht auf etwa geringere Erfordernisse in der Praxis. Und diese strenge Forderung des Gesetzes darf bei der Prüfung eines Sterilisationsverfahrens auch nicht umgangen werden durch „mechanische Reinigung", welche so viel vom Testobjekt — der sporenhaltigen Erde — mechanisch wegnimmt, daß dann weniger als vielleicht ein Hundertstel des erforderlichen Minimums davon in die Schlußkultur kommt.

3. Die Mitteilung Brekenfelds, daß von Instrumenten, die in 0,03proz. und in 0,01proz. Zephirollösung von ihm gekocht worden waren, ohne Entfernung des Zephirols doch in 35 Proz. bzw. in 48 Proz. Keime gewachsen sind, kann nicht als Beweis dafür anerkannt werden, daß auch die von Brekenfeld wirksam befundene 0,75proz. bzw. 2,0proz. Zephirollösung für etwaige Keimentwicklung in den Schlußkulturen unbedenklich gewesen wäre. Denn die von Brekenfeld als unschädlich für die Keimentwicklung befundenen Zephirolkonzentrationen von 0,03 bzw. 0,01 Proz. betragen ja nur 1/25 bzw. 1/75 oder 1/70 bzw. 1/200 der Zephirolkonzentrationen der Brekenfeldschen Hauptversuche.

Unsere Einwände gegen die Möglichkeit einer „Sterilisation" durch viertelstündiges Kochen in Zephirollösungen sind durch Brekenfelds Entgegnungen in keinem Punkte entkräftet worden und konnten das auch nicht, weil unsere Einwände auf der gesetzlichen Grundlage der Definition des Sterilisationsbegriffes im Arzneibuche für das Deutsche Reich ruhen.

Verantwortlich für die Redaktion: Prof. Dr. E. Gildemeister, Berlin-Dahlem, Unter den Eichen 93 II. Verantwortlicher Anzeigenleiter: Hans Schulz, Jena. Verlag und Anzeigenannahme: Gustav Fischer, Jena. D. A. 3. Vj. 1939: 1300. Druck: Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle), Jena/6849. Printed in Germany.

Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten
Erste Abteilung / Originale
144. Band Ausgegeben am 9. Oktober 1939 Heft 7/8

[Aus dem Institut für Allgemeine Zoologie und Parasitologie der k. ung. Palatin-Joseph-Universität für technische und Wirtschaftswissenschaften in Budapest (Direktor: Prof. Dr. A. Kotlán).]

Zur Frage der Wirtspezifität der Lungenwürmer.

Von A. Kotlán.

Die Frage der Wirtspezifität der Lungenwürmer erweckt das Interesse der Fachmänner, außer vom rein theoretischen, vielfach auch vom praktischen Gesichtspunkt. Während z. B. die wechselseitigen Beziehungen der Lungenwurmseuche des Wildes und unserer Haustiere schon des öfteren besprochen wurden, hat in letzterer Zeit die Frage, ob Lungenwürmer der Schafe auch das Rind befallen können, sogar zu forensischen Erwägungen Anlaß gegeben.

Die Angaben der meisten parasitologischen Lehrbücher sind, wie im folgenden veranschaulicht werden soll, keineswegs geeignet, ein klares Bild über das Ausmaß der Wirtspezifität der Lungenwürmer unserer Haustiere zu geben.

Man erfährt aus diesen Angaben, daß z. B. die in europäischen Schafen sehr häufige Art Protostrongylus rufescens (Leuck., 1865) außer dem Schaf und der Ziege auch beim Kaninchen (und teils auch Hasen) [Railliet (1915), Yorke und Maplestone (1926), Baylis (1929), Sprehn (1932), Mönnig (1934), Clunies Ross und Gordon (1936), Neveu-Lemaire (1936)], beim Reh [Railliet (1895), Neveu-Lemaire (1936), Fiebiger (1936), Hutyra-Marek-Manninger (1938)], beim Hirsch (deer) [Mönnig (1934)] und bei der Gemse [Hutyra-Marek-Manninger (1938)] vorkommt.

Protostrongylus commutatus (Dies., 1851) soll außer in Hasen und Kaninchen nach Sprehn (1932) „vielleicht" auch in Wiederkäuern, nach Fiebiger (1936) vielleicht auch im Schaf, Ziege und Reh vorkommen. Fiebiger glaubt übrigens, daß Protostrongylus rufescens vielleicht mit P. commutatus identisch ist. Letztere Auffassung soll auch Cameron (1933) teilen [zit. nach Bohn (1937)].

Auch für die einzelnen Arten der Gattung Dictyocaulus werden recht verschiedene Wirte angeführt. So finden wir für D. filaria außer dem Schaf und der Ziege als weitere Wirtstiere das Rind [Linstow (1878), Neveu-Lemaire (1936), Clunies Ross und Gordon (1936), Sprehn (1932)], Reh [Linstow (1878), Railliet (1895), Neveu-Lemaire (1936), Hutyra-Marek-Manninger (1938), Wetzel und Enigk (1937)], Rothirsch [Railliet (1895), Baylis (1929), Sprehn (1929), Clunies Ross und Gordon (1936), Neveu-Lemaire (1936), Fiebiger (1936), Hutyra-Marek-Manninger (1938)], Damwild [Linstow (1878), Railliet (1895), Sprehn (1929), Neveu-Lemaire (1936), Hutyra-Marek-Manninger (1938)], Gemse [Gebauer (1932), Fiebiger (1936), Neveu-Lemaire (1936)], Kamel [Railliet (1895), Baylis (1929), Clunies Ross und Gordon (1936), Neveu-Lemaire (1936), Hutyra-Marek-Manninger (1938)], Zebra [Sustmann (1918)] und experimentell sogar Meerschweinchen [Neveu-Lemaire (1936)] angegeben.

Dictyocaulus viviparus (Bloch, 1782), der Lungenwurm der Bovinen, soll nach Linstow (1878), Yorke und Maplestone (1926), Fiebiger (1936), Hutyra-Marek-Manninger (1938) auch bei Equiden „selten" oder „ausnahmsweise" anzutreffen sein.

Müllerius capillaris (A. Müll., 1889), ein häufiger Lungenwurm der kleinen Wiederkäuer, soll nach neueren Angaben (Wetzel und Enigk, Bohn) in verschiedenen Zerviden und auch im Wisent sehr häufig schmarotzen.

Sollten die angeführten Angaben sich als richtig und einwandfrei erweisen, so müßte man annehmen, daß die Wirtspezifität bei Lungenwürmern eine

kaum nennenswerte Rolle spielt. Wir haben jedoch genügende Gründe annehmen zu dürfen, daß dies nicht der Fall ist. um so weniger, da diese Angaben mit den tatsächlichen Verhältnissen zum großen Teil nicht in Einklang stehen.

Auf Grund unserer Erfahrungen, die sich in mancher Hinsicht mit der Auffassung neuzeitlicher, auf diesem Gebiet arbeitender Forscher decken, kann über die Wirtspezifität der Lungenwürmer folgendes zusammengefaßt werden.

Es scheint, daß sich aus der Reihe der in Haustieren und ihren wildlebenden Verwandten schmarotzenden Lungenwürmer eine am meisten ausgeprägte Wirtspezifität die Arten der Gattung **Protostrongylus** Kamensky (= Synthetocaulus Raill. u. Henry) erworben haben. Fassen wir die im Schaf, in wildlebenden Wiederkäuern (Hirsch, Reh, Gemse), sowie im Hasen vorkommenden Protostrongylus-Arten ins Auge, so zeigt es sich, daß, entgegen manchen Angaben, die Arten aus den genannten Wirten nichts miteinander zu tun haben. Im Schaf kommen Protostrongylus rufescens, ocreatus und wahrscheinlich noch 2—3 weitere „gute“ Arten vor, unter letzteren befindet sich aber niemals P. commutatus, welcher, wie schon Railliet (1895) richtig angibt, ein spezifischer Schmarotzer der Hasen ist. Kamensky [zit. nach Cameron (1927)] soll angeblich P. rufescens mit P. commutatus zusammen in Hasen angetroffen haben. Der Kamenskysche P. rufescens aus Hasen ist jedoch sicher nicht identisch mit P. rufescens aus dem Schaf und auch nicht, wie Cameron (1927) glaubt, identisch mit P. sagittatus aus Cervus elaphus; letzterer ist ein spezifischer Lungenwurm des Rothirschen und scheint der Art P. rupicaprae Gebauer aus der Gemse nahezustehen.

Protostrongylus commutatus kann auf Grund seines feineren Habitus, sowie des Fehlens der kammförmigen Struktur der Spicula, ferner der Beschaffenheit des paarigen Gubernaculum von P. rufescens leicht unterschieden werden. Auch die Größe und Gestalt der Schwanzspitze der Embryonen weicht von jener des P. rufescens ab. P. commutatus kann ferner auch von P. ocreatus Raill. u. Henry, 1907 ohne Schwierigkeit unterschieden werden entgegen der Ansicht Camerons (1927), wonach P. ocreatus möglicherweise als Synonym mit P. commutatus zu betrachten sei.

Schulz (1930?) hat mit dem Namen Protostrongylus kamenskyi n. sp. eine Art aus russischen Hasen beschrieben. Allem Anscheine nach handelt es sich um die von Kamensky seinerzeit als P. rufescens aus dem Hasen angesprochene Art. Sie besitzt eine charakteristische Provagina, wie eine solche auch bei P. sagittatus anzutreffen ist. Möglicherweise hat letzteres Merkmal Cameron bewogen diese, nebst P. commutatus in russischen Hasen vorkommende Art als P. sagittatus hinzustellen.

Railliet (1895) gibt an, P. rufescens auch beim Reh angetroffen zu haben. In Anbetracht der ziemlichen Aehnlichkeit der verschiedenen Protostrongylus-Arten scheint es kaum zweifelhaft, daß es sich auch in Railliets Fall nicht um P. rufescens, sondern eine andere Art handelte. Stroh und Schmid (1938) haben vor kurzem festgestellt, daß im Reh häufig eine Protostrongylus-Art vorkommt, die mit keiner der bisher beschriebenen Arten übereinstimmt. Sie nannten diese Art P. capreoli. Es ist kaum zweifelhaft, daß das vermeintliche Vorkommen von P. rufescens im Reh laut früheren Angaben, sich eigentlich auf diese Art bezieht.

Daß P. rufescens und P. commutatus auch in Gemsen nicht vorkommt, hat Gebauer (1932) nachgewiesen. Er gibt in seiner Arbeit an, daß er in dem von ihm untersuchten Lungenwurmmaterial aus Gemsen niemals P. rufescens oder P. commutatus, wohl aber zwei scheinbar für die Gemse spezifische Arten (P. austriacus und P. rupicaprae) antreffen konnte.

Diese Angaben scheinen auch durch die Befunde von Stroh (1936) eine Unterstutzung zu erfahren.

Eigene Untersuchungen, sowie auch die Erfahrungen von Stroh und Schmid (1938) sprechen schließlich dafur, daß P. rufescens auch im Rothirschen nicht vorkommt. In allen eigenen bisher untersuchten Fallen konnten die aus dem Hirschen stammenden Protostrongyliden als P. sagittatus bestimmt werden.

Zusammenfassend kann daher festgestellt werden, daß die eingangs angefuhrten Angaben uber die Pluralität der Wirte von Protostongylus rufescens auf eine unrichtige Bestimmung der jeweils angetroffenen Würmer zuruckzufuhren sind.

Nicht unerwähnt sollen die Arbeiten von Dikmans (1931, 1935), ferner von Schulz, Orlow und Kutass (1933) bleiben, die durch die Beschreibung neuer Protostrongyliden-Arten einen weiteren Beweis für die Wirtspezifität der Lungenwürmer lieferten. Allerdings muß darauf hingewiesen werden, daß die von letzteren Autoren vorgenommene Aufteilung der Gattung Protostrongylus (Synthetocaulus) kaum in jeder Hinsicht gerechtfertigt erscheint.

Anders verhält sich die Sache mit der Gattung Dictyocaulus. Die Spezifität der D.-Arten ist zwar weniger streng als bei Protostrongylus, daß selbe jedoch bis zu einem gewissen Grade dennoch besteht, beweist das getrennte Vorkommen der drei gut bekannten, nicht selten jedoch verkannten Arten D. filaria, viviparus und arnfieldi im Schaf (Ziege), Rind und Pferd.

Dictyocaulus filaria ist der häufigste Lungenwurm des Schafes und der Ziege; die Art kommt aber, wie es scheint, auch im Kamel, und zwar mit D. viviparus zusammen vor.

Es scheint, daß wir bislang einwandfreie Beweise über das Vorkommen dieser Art bei europäischen Zerviden (Reh, Hirsch, Damwild) nicht besitzen. Wetzel und Enigk (1937) geben zwar an, bei mehreren Rehen einen Befall mit D. filaria ermittelt zu haben, doch ist es aus ihrem Berichte nicht ersichtlich, ob die Diagnose auf Grund einer Bestimmung der aus Rehlungen gesammelten Würmer, oder aber auf Grund von Kotuntersuchungen gestellt wurde. Eine bloß auf Kotuntersuchung gegründete Diagnose gewährt aus mehrfacher Ueberlegung keine vollkommene Sicherheit, wie dies die Diagnosestellungen von Bohn (1937) zu beweisen scheinen[1]). Daß das Reh keine Empfänglichkeit für D. filaria besitzt, zeigen unsere Erfahrungen in Ungarn, wo Rehe sehr häufig, zum Teil ständig, Acker, Wiesen usw. besuchen, die auch von Schafen und Ziegen beweidet werden, ohne daß ein Befall mit D. filaria in selben jemals festgestellt werden konnte.

Angaben über das Vorkommen von D. filaria im Rind beruhen zweifelsohne auf einer falschen Bestimmung der angetroffenen Würmer. Bezüglich des Rindes sei darauf hingewiesen, daß die Möglichkeit einer Aufnahme von D. filaria-Larven seitens Weiderindern stets geboten ist, da Schafe, Ziegen und Rinder sehr oft dieselben Weiden besuchen. Systematisch durchgeführte Untersuchungen ergaben jedoch bisher in keinem Falle einen D. filaria-Befund beim Rind.

---

1) Wetzel und Enigk (1936) geben an, daß sie in der Losung eines Rehes Kokzidienoozysten sahen, „die sich bei näherer Untersuchung morphologisch als identisch mit Eimeria intricata aus dem Schaf erwiesen". Sollte die Wirtsangabe richtig sein, so müßte man daran denken, daß die betreffende Losung entweder nicht aus einem Reh stammte oder aber mit einer solchen eines richtigen Wirtes von Eimeria intricata in Berührung kam bzw. damit vermengt wurde, da E. intricata bisher nur in Ovinen nachgewiesen wurde und mit Rücksicht auf die strenge Wirtspezifitat der Kokzidien es nicht wahrscheinlich ist, daß die genannte Art auch in Zerviden vorkommen sollte.

Im Jahre 1937 wurde von einem südungarischen Tierbesitzer die Klage erhoben, daß sein Bestand von 20 Jungrindern durch lungenwurmkranke Schafe seines Nachbars mit Lungenwürmern angesteckt wurde. Die in der Folge eingesetzten Untersuchungen des von beiden Besitzern zu wiederholten Malen und sogar unter Verheimlichung der Herkunft eingesendeten Wurmmaterials bestätigten stets die absolute Wirtspezifität von D. filaria und D. viviparus.

Gelegentlich dieser Untersuchungen bot sich auch die Möglichkeit, D. filaria-Larven an ein 3 Monate altes Kalb künstlich zu übertragen. Das Tier erhielt in kurzen Zeitabständen ungefähr 10000 infektionstüchtige D. filaria-Larven per os. Nach Ablauf von 17 Tagen wurde das Tier geschlachtet und die Luftwege genau untersucht. Hierbei konnten insgesamt 3 junge, unreife Würmer (♀♀) angetroffen werden. Die Länge dieser Würmer betrug 8, 8,3 und 8,5 mm. Dieser Versuch spricht keineswegs dafür, daß die Ansiedelung von D. filaria im Rind, auch nur ausnahmsweise, möglich wäre.

Die Angabe Neveu-Lemaires, wonach D. filaria experimentell auch im Meerschweinchen zur Ansiedelung gelangen kann, muß dahin berichtigt werden, daß es bislang nicht gelang, in Meerschweinchen vollkommen reife Würmer, nach experimenteller Infektion, nachzuweisen. Aus Kauzals (1933) Bericht ist nur so viel ersichtlich, daß dieser Autor die mit 2000—7000 Larven künstlich infizierten 4 Meerschweinchen 24, 48 Std. bzw. 8 und 18 Tage nach der Infektion getötet und untersucht hat und im 2. und 3. Versuchstier je eine Larve im 3. bzw. 4. Stadium, im 4. Versuchstier aber ein unreifes ♂ und zwei unreife ♀♀ nachweisen konnte. In ähnlichen von uns ausgeführten Versuchen konnten in einem 25 Tage nach Verabreichung von etwa 2000 Larven an Lungenveränderungen verendeten Meerschweinchen 5 Würmer angetroffen werden, die zwar geschlechtsreif schienen und deren ♀♀ sogar einige unreife Eier im Uterus aufwiesen, doch kaum die Länge von 12 mm erreichten. Ein zweites Meerschweinchen zeigte am 18. Tage nach ähnlicher Infektion Symptome (erschwertes Atmen, Husten, Ausfluß aus der Nase, Appetitlosigkeit), die ebenfalls auf die Anwesenheit von Wurmexemplaren in der Lunge deuteten. Nach einigen Tagen trat jedoch Besserung ein, und gelegentlich der am 35. Tage erfolgten Obduktion konnten in den Luftwegen keine Würmer mehr angetroffen werden. Ein drittes Versuchstier wies nach der künstlichen Infektion überhaupt keine Symptome auf und blieb vollkommen frei von Lungenwürmern.

Aus diesen Versuchen geht klar hervor, daß das Meerschweinchen keineswegs zu den „Wirten“ von D. filaria gerechnet werden kann. Völlig resistent erwiesen sich Meerschweinchen in einigen Versuchen gegen D. viviparus.

Interessant ist das scheinbar unzweifelhafte Vorkommen von D. filaria im Kamel. Die in der Sammlung unseres Instituts befindlichen, von mir aus einem Kamel gesammelten Lungenwürmer gehören zu zwei Arten, und zwar allem Anscheine nach zu D. viviparus und D. filaria. Ob es sich trotz der morphologischen Uebereinstimmung der aus dem Kamel stammenden zwei Arten mit D. viviparus, bzw. D. filaria, nicht etwa um biologisch selbständige Arten handelt, müßte gegebenenfalls experimentell festgestellt werden.

Dictyocaulus viviparus ist der häufigste Lungenwurm der Bovinen und Zerviden. Die Angabe, wonach diese Art auch in Equiden vorkommen soll, kann kurzweg als unrichtig außer acht gelassen werden, um so mehr, da die ziemliche Aehnlichkeit von D. viviparus mit D. arnfieldi leicht zur Verwechslung beider Arten führen kann.

Die Gattung **Müllerius** scheint sich auf die kleinen Wiederkäuer zu beschränken. Wetzel und Enigk (1936) führen zwar an, Müllerius capillaris beim Wisent, ferner Elch und Edelhirsch, Bohn (1937) beim Reh, Rothirsch,

Damhirsch, sowie ebenfalls beim Elch nachgewiesen zu haben. Stroh und Schmid (1938) haben auf Grund ihrer Untersuchungen ihren Zweifel an der Richtigkeit der Angabe über das Vorkommen von Müllerius capillaris beim Reh und Rothirsch bereits ausgesprochen. Bezüglich des Vorkommens von Müllerius capillaris bei Rothirschen schließe ich mich der Ansicht von Stroh und Schmid an. In einigen Fällen konnte in Rothirschlungen bisher außer D. viviparus nur Protostrongylus sagittatus angetroffen werden. Die Embryonen letzterer Art sind zwar jenen des Müllerius capillaris, besonders hinsichtlich der Gestaltung der Schwanzspitze, ähnlich, doch etwas größer, außerdem besitzen sie ein fein granuliertes Aussehen. Nach meinen Messungen beträgt ihre Länge 400—428 μ, größte Breite (in der Korpermitte) 20 μ, die Entfernung des Porus excretorius vom Kopfende 115 μ, die Entfernung der Genitalanlage vom Körperende 128 μ, die Länge der Schwanzspitze vom Ursprung des Schwanzdornes gemessen 11,20 μ.

Zusammenfassung.

Der heutige Stand unserer Kenntnisse über die unzweifelhaften Wirte der häufigsten Lungenwurmarten läßt die Annahme zu, daß die Wirtspezifität, wie in den meisten Gruppen der parasitisch lebenden Tiere, so auch im Falle der Lungenwürmer eine vorherrschende Rolle spielt. Daß es Ausnahmen gibt oder eben eine Gradation im Bereiche der Spezifität nicht fehlt, ist aus biologischen Gründen leicht verständlich.

Aus der Gruppe der in Haustieren und ihren wildlebenden Verwandten schmarotzenden Lungenwürmer scheinen die Arten der Gattung Protostrongylus (= Synthetocaulus) eine besonders ausgeprägte Wirtspezifität erworben zu haben. Die gegenwärtig gut umschriebenen Arten dieser Gattung kommen in folgenden Wirten vor: Protostrongylus rufescens in Schaf, Ziege (?); P. ocreatus im Schaf; P. commutatus im Hasen, Kaninchen; P. kamenskyi im Hasen; P. capreoli im Reh; P. sagittatus im Rothirsch; P. austriacus und rupicaprae in der Gemse.

Auch die Arten der Gattung Dictyocaulus scheinen spezifische Wirte vorzuziehen. Dictyocaulus filaria lebt in kleinen Wiederkäuern: Schaf, Ziege, Gemse, außerdem aber auch im Kamel. Ihr Vorkommen in Zerviden (Reh) ist nicht sicher erwiesen. Im Rind kommt diese Art nicht vor, sie läßt sich auch künstlich nicht definitiv übertragen. Dasselbe gilt auch für das Meerschweinchen. Völlig resistent ist nach A. u. M. Hobmaier (1930) gegen D. filaria auch das Pferd.

Dictyocaulus viviparus kommt in Bovinen, Zerviden und anscheinend auch im Kamel vor. Angaben über das Vorkommen dieser Art in Equiden ist auf eine Verwechslung mit D. arnfieldi zurückzuführen.

Als sichere Wirte der Gattung Müllerius können bislang nur das Schaf, die Ziege und Gemse betrachtet werden. Anders lautende faunistische Angaben auf Grund des Nachweises von Embryonen allein entbehren der Zuverlässigkeit, mit besonderer Rücksicht auf die ziemlich ähnlichen morphologischen Verhältnisse der Embryonen der meisten Protostrongylus- und Müllerius-Arten.

Schrifttum.

Baylis, H. B., A Manual of Heminthology. London 1929. — Bohn, Diss. Berlin, 1937. — Cameron, J. of Heminth. **5**, 1 (1927). — Clunies Ross a. Gordon, The Internal Parasites and Parasitic Diseases of Sheep. Sydney 1936. — Dikmans, Proc. U.S. Nat. Mus. **79**, 1 (1931). — Ders., Trans. Micr. Soc. **54**, 138 (1935). — Fiebiger, Die tierischen Parasiten der Haus- und Nutztiere usw., 3. Aufl., Berlin u. Wien 1936. — Gebauer, Z. Parasitenkde **4**, 147 (1932). — Hobmaier, A. u. M., Münch. tierarztl. Wschr. **81**, Nr 29 (1930). — Hueber, Zbl. Bakter. I Orig. **105**, 216 (1926). — Hutyra-Marek-Manninger, Spez. Pathol. u. Ther. d. Haustiere, 7. Aufl., 2. Bd., Jena 1938. — Kauzal, Australian Vet. J. **1933**, 2. — Linstow, Compendium d. Helminth. Hannover 1878—1889. — Lutz, L., Diss. München, 1926. — Monnig, Veterinary Helminthology etc., 2. edit. London 1938. — Mueller, Dtsch. Z. f. Tiermed. **15** (1889). — Neveu-Lemaire, Traité d'Helminthologie. Paris 1936. — Railliet, Traité de zoologie médicale et agricole, 2. édit. Paris 1895. — Railliet et Henry, C. r. Soc. Biol. **63**, 751 (1907). — Schmid, F., Tierarztl. Rdsch. **35** (1929). — Schulz, Arb. der 32. u. 38. helminth. Exped. im Jahre 1926—27 (russ.), 1930. — Schulz, Orlow u. Kutass, Zool. Anzeiger **102**, 303 (1933). — Sprehn, Lehrb. d. Helminthologie. Berlin 1932. — Stroh, Berl. tierarztl. Wschr. **1936**, 696. — Stroh u. Schmid, Ebenda **1938**, 121. — Sustmann, Ebenda **1918**, 283. — Wetzel u. Enigk, Sitzungsber. Ges. Naturf.-Freunde vom 21. April 1936. — Dies., ebenda vom 19. Jan. 1937. — Yorke a. Maplestone, The Nematode Parasites of Vertebrates. London 1926.

[Aus dem Institut für Schiffs- und Tropenkrankheiten in Hamburg
(Direktor: Prof. Dr. P. Mühlens)
Protozoologische Abteilung (Vorsteher: Prof. Dr. E. Reichenow).]

Protozoen der offenen Körperhöhlen des Menschen in experimentellen Abszessen.

Von Albert Westphal.

Von allen Protozoen der offenen Körperhöhlen des Menschen, also des Mundes, Darmes und der Vagina, ist die Ruhramöbe, E. histolytica, wohl das Protozoon, das am häufigsten außerhalb der offenen Körperhöhlen, in diesem Falle des Darmlumens, im eigentlichen Körperinnern vorkommt. Dabei kommt es in den befallenen Organen zu Abszeßbildungen. Die Amöbenruhr selbst ist eine besondere Art einer Abszeßbildung in der Darmwand. Abszeßbildungen, teilweise von beträchtlichem Ausmaße, treten weiterhin vorwiegend in der Leber auf. Aber auch in anderen Organen sind Amöbenabszesse beschrieben, nämlich Lungenabszesse, Gehirnabszesse, Kieferabszesse, Hautabszesse und Genitalabszesse. Abgesehen von den Abszeßbildungen im Darm selbst sind die Leberabszesse am häufigsten. Von den übrigen Darmamöben sind Abszeßbildungen nicht bekannt.

Betreffs der Lungen- und Kieferabszesse läßt sich der Einwand erheben, daß es sich hierbei vielleicht nicht immer um E. histolytica-Abszesse handelt; stehen doch diese Organe mit der Mundhöhle in Verbindung, in der die Entamoeba gingivalis als häufiger Parasit anzutreffen ist, eine Amöbe, die der E. histolytica morphologisch sehr ähnlich ist. Dieser Einwand gewinnt dadurch an Begründung, daß auch ein anderer Parasit der Mundhöhle, die Trichomonasart T. elongata, häufig bei Abszeßbildungen an den Zahnwurzeln, aber auch bei Lungengangrän in der Lunge anzutreffen ist. Von der Trichomonasart der Scheide, T. vaginalis, wird angegeben, daß dieser Parasit bei Abszeßbildungen der weiblichen Genitalorgane angetroffen wird. Und die

Trichomonaden des Darmes wurden bereits in Abszessen der Leber nachgewiesen. Von dem Infusor Balantidium coli sind meines Wissens Abszesse in entfernt gelegenen Organen nicht bekannt, nur in der Darmwand kommen die Balantidien in ähnlichen Veränderungen wie bei der Amöbenruhr vor.

Es ist nicht verwunderlich, wenn auf Grund dieser Befunde den Protozoen der offenen Körperhöhlen oftmals eine beträchtliche Pathogenität zugeschrieben wird. Neuere Untersuchungen zur Virulenz der E. histolytica haben jedoch selbst für dieses Protozoon die Ansichten über dessen pathogenetische Aktivität grundlegend geändert. Wir müssen heute annehmen, daß die Ruhramöbe bei einem normalen Zustand des Darmgewebes ihren normalen Lebensraum, das Darmlumen, nicht überschreiten kann. Wir haben keinen Beweis dafür, daß überhaupt irgendein Protozoon der offenen Körperhöhlen von sich aus imstande ist, in das seinen Lebensraum umgebende Gewebe einzudringen, solange dieses seine normalen Funktionen und Reaktionen ausübt, d. h. solange es ungeschädigt ist. Das gilt auch für die E. histolytica, von der feststeht, daß sie allerdings in einigen Geweben, z. B. in der Submukosa, wenn sie erst einmal eingedrungen ist, selbst, ohne erkennbare fremde disponierende Faktoren, diese Gewebe aufzulösen vermag. Und doch ist auch bei dieser Amöbe anderen Geweben gegenüber, z. B. denen der Leber, in der noch am häufigsten Amöbenabszesse auftreten, die pathogenetische Aktivität begrenzt. Müssen doch bei jeder Amöbenruhr ganz offenbar mit dem venösen Blut Amöben der Darmwand in die Leber verschleppt werden, ohne daß es gleich zu Ansiedlungen der Amöben in der Leber unter Abszeßbildungen kommen muß.

Diese Anschauung über die relative Geringgradigkeit der pathogenetischen Aktivität der Protozoen der offenen Körperhöhlen läßt Zweifel über die Ursächlichkeit dieser Protozoen bei vielen Abszeßbildungen aufkommen. Um nun über das Verhalten dieser Protozoen in Abszessen anderer Ursachen, besonders in bakteriellen Abszessen, einen Anhaltspunkt zu bekommen, habe ich mit verschiedenem bakterienhaltigen Protozoenmaterial subkutane und intramuskuläre Abszesse experimentell bei Ratten erzeugt und vergleichend beobachtet. Darüber soll in nachstehendem berichtet werden.

Als Versuchstier wurde vorwiegend die Ratte gewählt. Da die Abszesse mit Material aus bakterienhaltigen Protozoenkulturen erzeugt wurden, war es erforderlich, eine Versuchstierart zu wählen, die nicht zur Sepsis neigt, wie dies auf Grund meiner Vorversuche bei Kaninchen und Meerschweinchen der Fall ist. Bei Ratten, denen etwa 1 ccm der Kulturaufschwemmung in physiologischer Lösung subkutan oder intramuskulär in die Oberschenkel der Hinterbeine injiziert wurde, bleibt der Infektionsprozeß in Form des Abszesses lokal begrenzt, ist abtastbar und kann ohne Gefahr gleichzeitig an beiden hinteren Oberschenkeln erzeugt werden. Nur bei Injektionen mit Zökuminhalt des Schweines war eine hohe Sterblichkeit der Versuchsratten zu verzeichnen. Die Abszesse sind meist nach 3—4 Tagen schon gut ausgebildet und in etwa 14 Tagen verheilt. Schwankungen sind naturgemäß bei verschiedenen Kulturstämmen durch die jeweils andersartigen Begleitbakterien gegeben.

Versuchsergebnisse.

Amöben: Abszesse wurden mit gewöhnlichen bakterienhaltigen E. histolytica- und E. gingivalis-Kulturen erzeugt, waren also ihrem Wesen nach bakteriell. Die Untersuchung der Abszesse auf Amöben geschah durch die Frischuntersuchung des zentralen Eiters, durch Frischuntersuchung abgekratzten Materials von der Abszeßwand, durch Anlage von Kulturen und durch Schnittuntersuchungen fixierter und gefärbter Abszeßwandpräparate.

Bei den E. histolytica-Kulturabszessen konnten durch die Frischuntersuchungen in 10 Fällen keine Amöben erkannt werden. In den mit Hämatoxylin-Delafield und Eosin gefärbten Schnittpräparaten der Abszeßwände konnten ebenfalls keine Amoben nachgewiesen werden. Von den letzten 3 Abszessen wurden daraufhin Kulturen angelegt. Dadurch gelang es in einem Falle, aus abgekratztem Material der Abszeßwand in dem Nährboden von Dobell-Laidlaw Amöben zu züchten. Von 6 Rohrchen war jedoch nur 1 Rohrchen positiv, woraus zu ersehen ist, daß offenbar nur wenige Amöben im Abszeß vorhanden waren. Dadurch erklärt sich auch der negative Befund im Schnittpräparat. Jedenfalls kann, wie durch diesen Befund bewiesen ist, E. histolytica in bakteriellen Muskelabszessen bei Ratten zur Entwicklung kommen.

Bei den E. gingivalis-Kulturabszessen konnten weder in den Frischpräparaten noch durch die Kultur auf S-SA-Nährboden (Westphal 1935 u. 1936), noch im Schnitt Amöben nachgewiesen werden. Alle 12 erzeugten Abszesse müssen demnach als amöbenfrei angesehen werden.

Flagellaten: Hinsichtlich der menschenparasitären Trichomonaden wurden Kulturen von T. hominis, T. vaginalis und T. elongata injiziert. Positive Abszesse konnten mit allen 3 Trichomonasarten erzielt werden, jedoch ist die Häufigkeit, mit der sich die Trichomonaden in den Abszessen entwickeln, verschieden. In 4—5 Tage alten Abszessen zeigt T. elongata stets gute Entwicklung. Mit den benutzten Stämmen war selbst bei sehr schwach positiven Kulturen mit einer sicheren Entwicklung von T. elongata zu rechnen. Die Trichomonaden waren im ganzen Abszeßinnern anzutreffen und gedeihen vorzüglich in dem nekrotisch zerfallenen Gewebe. Der Nachweis der Trichomonaden gelingt ohne Schwierigkeiten im frischen Präparat schon bei mittlerem Trockensystem, da sie durch ihre Bewegung leicht aufzufinden und zu erkennen sind. Im ganzen wurden 22 Abszesse mit T. elongata hervorgerufen. In 10 Tage alten Abszessen war schon etwa die Hälfte trichomonasfrei. In diesen war aber auch schon die Bakterienbereinigung erfolgt, so daß mit dem Abklingen des bakteriellen Prozesses und dem Einsetzen der Gewebsregeneration auch die Flagellaten zugrunde gehen.

Während junge, aber bereits gut ausgebildete Abszesse mit T. elongata stets Trichomonaden enthielten, ergab sich, daß T. vaginalis und T. hominis nicht in allen Abszessen zur Entwicklung kommen. Dabei nimmt T. vaginalis eine Mittelstellung ein. Von beiden Trichomonasarten wurden je 14 Abszesse erzeugt, davon ging die Infektion mit T. vaginalis etwa in der Hälfte der Fälle an, T. hominis jedoch nur bei $\frac{1}{4}$ der Abszeßbildungen. Die positiven T. hominis-Abszesse wiesen durch ihre üble Geruchsbildung auf abweichende bakterielle Infektionen hin.

Es wäre falsch, auf Grund zahlenmäßig so kleiner Versuchsreihen dem Infektionsindex besondere Bedeutung zuzuweisen, zumal für die T. hominis-Infektionen nur ein Flagellatenstamm in der Kultur zur Verfügung stand. Das T. vaginalis-Material stammte ebenfalls nur aus einem Kulturstamm, während für die T. elongata-Versuche drei Stämme zur Verfügung standen. Dennoch mochte ich annehmen, insbesondere auch auf Grund der Stärke der Abszeßinfektionen mit T. elongata, daß diese Art besonders leicht in bakteriellen Abszessen zur Entwicklung kommt.

Hinsichtlich des Verlaufs der Abszesse gilt für die T. vaginalis- und T. hominis-Abszesse dasselbe wie für T. elongata. Mit der Ausheilung der bakteriellen Schädigung erfolgt auch das Zugrundegehen der Flagellaten. Um diese Beobachtung einwandfrei zu bestätigen, wurden vergleichende Untersuchungen mit allen 3 Flagellatenarten angestellt. Es wurden jeweils 8 Abszesse mit den bakterienhaltigen Flagellatenkulturen und gleichzeitig an Kontroll-

ratten 8 Abszesse mit den zugehorigen, durch vorsichtiges Zentrifugieren und Filtrieren flagellatenfreien Begleitbakterien erzeugt. Dabei ist besonders auf das Zentrifugieren Wert zu legen, da die Trichomonaden teilweise durch Filtrierpapier nicht zurückgehalten werden. Eine diesbezugliche Kontrolle erfolgt am besten durch die Anlage von Kulturen. Ein Vergleich des Abszeßverlaufes, insbesondere des Zeitpunktes der Abszeßheilung, ergab, daß die trichomonashaltigen Abszesse genau zu derselben Zeit heilen wie die nur bakteriellen Abszesse, daß also eine Beeinflussung des Krankheitsverlaufes durch die Flagellaten bei den bakteriellen Muskelabszessen der Ratten nicht erfolgt.

Dieses Ergebnis stimmt mit dem histologischen Befund im gefärbten Schnittpräparat der Abszeßwande trichomonashaltiger Abszesse uberein. Bei keiner Trichomonasart konnten bei Heidenhain-Färbung, Delafield-Färbung und Giemsa-Feuchtfärbung Flagellaten im Gewebe nachgewiesen werden. Dabei ist allerdings zu berucksichtigen, daß der Nachweis der Trichomonaden in derartigen Präparaten nicht einfach ist, wenn die Differenzierung ausreicht, um eine brauchbare Gewebsfärbung zu ergeben.

Von den menschenparasitären Flagellaten wurden außerdem noch Abszeßbildungen mit Chilomastix mesnili- und Enteromonas hominis-Kulturen versucht.

Mit Chilomastix mesnili-Kulturen wurden 3 Abszesse subkutan und 3 Abszesse intramuskulär erzeugt. Nach 7 Tagen waren die Abszesse zwar noch gut ausgebildet, enthielten jedoch keine Flagellaten.

Auch Enteromonas hominis-Kulturen wurden fur die Erzeugung von je 3 subkutanen und intramuskulären Abszessen der Ratten verwendet, ohne daß in den Abszeßbildungen die Flagellaten wieder angetroffen werden konnten.

Schließlich wurden noch mit Kulturen von Balantidium coli 4 Abszesse versucht, die ebenfalls negativ blieben, obwohl die Abszesse bakteriell gut entwickelt waren. 6 weitere Abszeßversuche direkt mit Zökuminhalt vom Schwein, der außerdem Trichomonas suis enthielt, führten zu keinem Erfolg, da die Ratten vor Ausbildung der Abszesse alle an einer Sepsis zugrunde gingen.

Folgerungen.

In den bakteriell bedingten Muskelabszessen kommen die Mund-, Vaginal- und Darmtrichomonaden und die Entamoeba histolytica zur Entwicklung. Die Sicherheit, mit der die Protozoen in den Abszessen nachgewiesen werden können, entspricht der eben gegebenen Reihenfolge. Alle übrigen untersuchten Protozoen kommen nicht zur Entwicklung, jedenfalls konnte eine solche nicht nachgewiesen werden.

Betrachten wir zunächst die Trichomonaden. Alle untersuchten Kulturstämme entwickeln sich im Innern des Abszesses, die Mundtrichomonaden am leichtesten, die Darmtrichomonaden am schwersten. Jedoch bei keiner Art konnte eine Beeinflussung des Krankheitsprozesses beobachtet werden. Es ist bekannt, daß T. elongata häufiger bei Entzündungen und Abszeßbildungen in der Mundhöhle angetroffen wird. Dennoch wird dieses Flagellat nicht für die Entstehung dieser Prozesse wie etwa der Alveolarpyorrhöe oder gar einer Lungengangrän verantwortlich gemacht. Diese Auffassung stimmt mit den beschriebenen Versuchsergebnissen überein. Die Flagellaten finden einen günstigen Nährboden, in dem sie sich reichlich entwickeln, ohne auf das Krankheitsbild von erkennbarem Einfluß zu sein.

Aehnlich liegen nach den obigen Befunden die Verhältnisse für T. vaginalis, nur daß dieses Flagellat nicht ganz so regelmäßig in den Abszessen zur Entwicklung kommt. Aber gerade für T. vaginalis wird in letzter Zeit wiederholt eine pathogenetische Bedeutung für Abszeßbildungen nach Aszension im

Urogenitalsystem der Frau angenommen (Hees 1933, 1935, 1936). Die Tatsache, daß sich T. vaginalis schlechter in den Abszessen entwickelt als T. elongata und ebenso schnell in den bakteriell gereinigten und ausheilenden Abszessen zugrunde geht, spricht gegen eine solche Auffassung. Auch die Untersuchungen von Wittfogel (1935) können keineswegs eine pathogenetische Wirkung von T. vaginalis beweisen. Dieser Autor injizierte T. vaginalis-Kulturen bei Mäusen und Meerschweinchen intraabdominal, intrahepatal und subkutan. In den entstehenden Abszeßbildungen konnten die Flagellaten nachgewiesen werden. Die Tatsache, daß die Versuchstiere zugrunde gehen, glaubt Wittfogel als Beweis der Pathogenität der Trichomonaden deuten zu müssen. Die Bakterien, die in Wirklichkeit zum Tode der Versuchstiere führten, werden von Wittfogel vollkommen übergangen. Die Untersuchungen über die in bakterienfreien Medien lebenden Rindertrichomonaden, T. foetus, können hinsichtlich ihrer physiologischen Auswertung und ihrer experimentellen Bearbeitung nicht ohne weiteres auf T. vaginalis übertragen werden.

Für die Darmtrichomonaden gilt hinsichtlich der Pathogenität das über T. vaginalis Gesagte, nur daß hier die Neigung zur Entwicklung in Abszessen noch geringer ist. Aber auch hier kann eine Ansiedlung in andersartigen Abszessen eintreten. Auf natürlichem Wege kann durch Verschleppung mit dem Blut gelegentlich eine Entwicklung in Leberabszessen erfolgen (Wagner 1935, Nachweis bei Katzen).

Während die Trichomonaden im nekrotisch zerfallenen Gewebe im Abszeßinnern zur Entwicklung gelangen, gedeiht die Entamoeba histolytica offenbar vorwiegend an der Darmwand. Die Entwicklung der Amöben in den bakteriellen Muskelabszessen ist vermutlich spärlich, was entweder darin begründet liegt, daß entgegen den Flagellaten hier eine direkte ernährungsphysiologische Abhängigkeit vom Gewebe der Abszeßwand besteht und die Muskulatur kein günstiger Nährboden für die Amöbe ist oder die Bakterienentwicklung mit ihren Zersetzungsprodukten sich schädigend auf die Amöben auswirkt. Sind doch die natürlichen abszeßartigen Prozesse in der Darmwand und in der Leber bei der Amöbiasis zunächst keine echten Abszesse. Nach einer vorübergehenden primären, teils wohl auch bakteriellen Schädigung, auf Grund der es zu einer Ansiedlung der Amöben kommt, erfolgt zunächst der Vorgang der Histolyse lediglich durch die Amöben, die damit die Tätigkeit der Leukozyten in den echten Abszessen übernehmen. Erst nach einer Ansammlung von Zerfallsprodukten in der Leber oder nach sekundärer Infektion der Geschwüre im Darm kommt es zur Einwanderung von Leukozyten in diese abszeßartigen Bildungen. Trotz dieser Unterschiede gegenüber den bakteriell bedingten Muskelabszessen bei den Ratten kann, wie die Versuche zeigten, in letzteren eine Entwicklung von E. histolytica eintreten.

Zu den in den Abszessen nicht zur Entwicklung gekommenen Protozoen gehört die Mundamöbe E. gingivalis. Die Feststellung ist deshalb von Bedeutung, weil durch sie die Annahme, daß diese Amöbe gelegentlich in Kiefer- oder Lungenabszessen zur Entwicklung kommen kann, nicht gestützt wird. Obwohl gerade bei dieser Amöbe stets Kulturen angelegt wurden auf Nährböden, die bei Munduntersuchungen einen guten Nachweis gestatteten und eine große Häufigkeit ergaben (nach noch nicht veröffentlichten Untersuchungen: 72,6 Proz.), erscheint mir die Entwicklungsfähigkeit dieser Amöbe in richtigen Abszessen sehr in Frage gestellt zu sein.

Daß die übrigen Protozoen der offenen Körperhöhlen des Menschen in den Abszessen nicht zur Entwicklung kamen, stimmt mit den praktischen klinischen Erfahrungen überein.

Zusammenfassung.

Im Hinblick auf das gelegentliche Vorkommen einiger Protozoen der offenen Körperhöhlen des Menschen in Abszessen verschiedener Organe wird die Entwicklungsmöglichkeit dieser Protozoen in experimentellen, bakteriellen Muskelabszessen bei Ratten untersucht. Bakterienhaltige Kulturen der Protozoen wurden intramuskulär und subkutan injiziert.

In den Muskelabszessen bei Ratten kommen Trichomonas elongata, T. vaginalis und T. hominis sowie Entamoeba histolytica zur Entwicklung. Chilosmastix mesnili und Enteromonas hominis sowie Balantidium coli und Entamoeba gingivalis konnten weder im frischen oder gefärbten Präparat noch in gefärbten Schnitten der Abszeßwandungen nachgewiesen werden. Auch mit Hilfe der Kulturverfahren gelang der Nachweis nicht.

Die Trichomonaden leben im nekrotisch zerfallenen Gewebe im Abszeßinnern. T. elongata gedeiht leicht und reichlich, T. hominis unregelmäßiger, T. vaginalis nimmt eine Mittelstellung ein. Das Krankheitsbild, insbesondere die Krankheitsdauer der bakteriellen Abszesse, bleibt durch die Flagellaten vollkommen unbeeinflußt.

E. histolytica gedeiht in diesen bakteriellen Abszessen nur spärlich und bevorzugt offenbar die Abszeßwände.

Die Feststellung, daß E. gingivalis offenbar nicht zur Entwicklung kommt, spricht gegen die Anschauung, daß diese Amöbe in Kiefer- oder Lungenabszessen vorkommen kann.

Daß sich die übrigen untersuchten Protozoen in den Abszessen nicht entwickelten, stimmt mit den praktischen klinischen Erfahrungen überein.

Schrifttum.

Hees, E., Klin. Wschr. **1933**, 1697. — Ders., Ebenda **1935**, 240. — Ders., Gynéc. et Obstétr. **34**, 191 (1936). — Wagner, O., Arch. Schiffs- u. Tropenhyg. **39**, Beih. 1 (1935). — Westphal, A., Arch. Schiffs- u. Tropenhyg. **39**, 106 (1935). — Ders., Zbl. Bakter. I Orig. **137**, 366 (1936). — Wittfogel, H., Dtsch. tierärztl. Wschr. **1935**, 310.

[Aus dem Institut für Schiffs- und Tropenkrankheiten in Hamburg (Direktor: Prof. Dr. P. Mühlens) Protozoologische Abteilung (Vorsteher: Prof. Dr. E. Reichenow).]

Infektionsversuche mit Blastozystis[1].

Von Wilhelm Reyer.

Einleitung.

Die Frage, ob die bei Menschen und Tieren vorkommenden Blastozysten als nur ein und dieselbe Art aufzufassen sind, ist noch nicht geklärt. Während Alexeieff (1911) annimmt, daß die bei Amphibien, Reptilien, Ratte und

1) Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Mensch vorkommenden Blastozysten alle der gleichen Art, der von ihm aufgestellten Art Blastocystis enterocola, angehören, stellt Brumpt (1912) für verschiedene Tierarten und für den Menschen verschiedene Blastozystis-Arten auf, ohne allerdings irgendwelche Begründungen hierfür zu geben. Durch Infektionsversuche wurde versucht, hier Klarheit zu schaffen.

Material und Methode.

Für die Infektionsversuche wurden Blastozystis-Stämme aus dem Menschen und aus der Ratte benutzt. Als Versuchstiere dienten Hunde, Ratten und weiße Mäuse aus dem Bestand des Hamburger Tropeninstituts. Während die Hunde und Mäuse stets uninfiziert gefunden wurden, erwiesen sich die älteren Ratten fast immer bereits natürlich infiziert, dagegen waren die jungen, eben der Mutter entwachsenen Ratten meist uninfiziert und somit für die Infektionsversuche geeignet.

Die Kotkontrolle erfolgte ausschließlich mit der von mir (Reyer, 1938) schon früher beschriebenen Kulturmethode; die Röhrchen wurden mit etwas frisch abgesetztem zerriebenem Kot beimpft und bis zur Kontrolle nach 2—4 Tagen im 37°-Schrank bebrütet.

Die Hunde wurden mittels Schlundsonde mit einer Kotaufschwemmung in Ringerlösung infiziert, die Ratten und Mäuse nach eintägigem Hungern mit einem gut durchmischten Brei aus feuchtem Brot und Infektionsmaterial gefüttert, das meist in kürzester Frist verzehrt wurde. Sowohl von der Kotaufschwemmung als auch von dem Gemisch wurden nach der Infizierung Kontrollkulturen angelegt; nur wenn diese Kulturen positiv wurden, wurde der Versuch als einwandfrei betrachtet. Einige Ratteninfektionsversuche mißlangen, da die einige Tage vor dem Versuch positiv gefundenen Ratten am Tage der Infektion aus unbekannten Gründen plötzlich negativ waren.

Versuche.

Vorversuche zeigten, daß eine Infizierung zumindest der Ratten mit Blastozystis sehr leicht möglich sein mußte; einzelne infizierte Ratten, die zu nichtinfizierten in einen Käfig gesetzt wurden, infizierten im Laufe weniger Tage sämtliche anderen. Auch in danebenstehenden Käfigen wurden die Ratten nicht selten positiv, was die Infektionsversuche zu Anfang sehr störte. Später wurden die Käfige mit infizierten Ratten von denen mit nichtinfizierten räumlich weit getrennt.

Die Auffindung von verschiedenen Entwicklungsformen in der Kultur veranlaßte mich in einer früheren Arbeit (Reyer, 1939) zur Aufstellung von 3 Typen der Blastozysten, die sich wie folgt unterscheiden:

Typ I: Kleine Blastozysten von meist kugeliger Gestalt; Vermehrung durch Zweiteilung und meist einfache Knospung.

Typ II: Große Blastozysten von meist kugeliger Gestalt; Vermehrung durch multiple Knospung, daneben auch durch Zweiteilung und einfache Knospung.

Typ III: Meist große Blastozysten von oft stark verzweigtem Bau; Vermehrung meist durch Knospung, wobei die Knospen häufig an der Abschnürungsstelle zugespitzt sind.

Hervorzuheben ist hierbei noch, daß ich Typ II und III nur beim Menschen finden konnte.

1. Infektionsversuche an Ratten mit Blastozysten aus der Kultur.

Der einfachste Weg, die Artfrage bei Blastozystis durch Infektionsversuche zu lösen, schien mir zunächst der zu sein, die Versuchstiere mit Blastozysten aus der Kultur zu infizieren, weil bei diesen Typ und Herkunft gut bekannt waren. Die diesbezüglichen Versuche an Ratten mißlangen sämtlich, sowohl mit von Ratten als auch mit vom Menschen stammenden Blastozysten, selbst in Fällen, in denen nur 4 Tage lang in Kultur gehaltene Rattenblastozysten verfüttert wurden.

Das könnte nun seine Ursache darin haben, daß die Blastozysten, die in der Kultur weit größer sind als im Kot, erheblich empfindlicher sind gegen die Verdauungssäfte des Magens und des Dünndarms als die Kotblastozysten und zugrunde gehen, bevor sie ihr Wohngebiet – Zökum und Kolon (Reyer, 1938) – erreicht haben. Infolgedessen wurde versucht, die Ratten durch Injektion von Blastozysten aus der Kultur in das Zökum direkt zu infizieren. Im ganzen wurde bei 7 Ratten eine derartige Zökalinjektion mit Kultur-Blastozysten gemacht, und zwar:

bei 3 Ratten mit Klon D (aus dem Menschen, Typ I),
„ 4 „ „ Stamm XX („ der Ratte, Typ I).

In 3 dieser Fälle, davon einmal nach Injektion menschlicher Blastozysten, gelang vorübergehend und nur am Tage nach der Injektion der Nachweis von Blastozysten im Kot der Ratten. Zahlreiche Parallelversuche, Ratten durch Injektion von mit Ringerlösung bzw. Serumlösung verdünnten Zökuminhalt infizierter Ratten ins Zökum zu infizieren, zeitigten ein absolut negatives Ergebnis.

2. Infektionsversuche an Ratten mit Blastozysten aus Rattenkot.

Daraufhin wurden Ratten mit Blastozysten aus Rattenkot infiziert; hierbei gelang die Infektion in allen Fällen. Bemerkenswerterweise wurden die Ratten nicht sofort im Kot positiv, sondern erst nach einer Inkubationszeit, die meist 3 Tage, selten etwas länger dauerte. Sie dürfte am einfachsten so zu erklären sein, daß die Blastozysten zunächst das Zökum besiedeln, und von hier aus allmählich abwärts in den Dickdarm und Enddarm wandern, bis sie schließlich im Kot erscheinen.

3. Infektionsversuche an Ratten mit Blastozysten aus dem menschlichen Kot.

Weiterhin wurden zahlreiche Infektionsversuche an Ratten mit Blastozysten aus dem menschlichen Kot durchgeführt. Im ganzen wurden 5 verschiedene Stämme, davon 3 von Typ I und je einer von Typ II und Typ III, zur Infektion benutzt, mit denen insgesamt 22 Ratten infiziert wurden. Hierbei wurde so verfahren, daß meist je 2 Ratten mit dem frischen und 2 andere mit demselben, 2 Tage alten Kot infiziert wurden.

Lediglich in einem Fall – Stamm XXI, Typ I – wurde bei 2 von 4 Ratten, und zwar je einer der am 1. und 3. Tage infizierten, eine vorübergehende Infektion am 3. Tage nach der Infizierung erzielt.

4. Infektionsversuche an Hunden mit menschlichen Blastozysten.

3 Hunde wurden mit menschlichen Blastozysten infiziert, und zwar zunächst mit Stamm XXIV (Typ I), später mit Stamm XIII (Typ II). Der Infektionsversuch verlief bei allen 3 Hunden in beiden Fällen völlig negativ. Die Kotkontrolle wurde zuletzt 8 Tage nach der zweiten Infizierung vorgenommen.

5. Infektionsversuche mit Rattenblastozysten an weißen Mäusen.

Im ganzen wurden 8 weiße Mäuse mit Blastozystis-Stämmen aus 2 verschiedenen Ratten infiziert; das Infektionsmaterial entstammte teils dem Kot, teils dem Zökuminhalt der Ratten. Die Kontrollkulturen des Infektionsmaterials sowie die Kontrollinfektionsversuche an 4 Ratten wurden sämtlich positiv. Von den 8 Mäusen dagegen waren nur bei einer, und zwar am 3. Tage nach der Infizierung, Blastozysten im Kot nachzuweisen, bei der nächsten Kotkontrolle, 2 Tage später, war auch diese Maus bereits wieder

negativ. Bemerkenswert ist in diesem Fall die Tatsache, daß die Maus am 3. Tage nach der Infizierung positiv wurde, demselben Zeitraum also, der bei der Infizierung der Ratten mit Rattenblastozysten und auch bei der vorübergehenden Infizierung von 2 Ratten mit menschlichen Blastozysten als Inkubationszeit festgestellt worden war.

Auswertung.

Die Versuche haben zunächst ergeben, daß die Blastozysten in der Kultur ihre Infektionsfähigkeit für ihren natürlichen Wirt sehr schnell verlieren. Dagegen spricht auch nicht, daß in einigen Fällen bei Injizierung von Blastozysten aus der Kultur vorübergehend im Kot der Ratten Blastozysten nachzuweisen waren; diese Fälle erklären sich so, daß die injizierten Blastozysten, soweit sie nicht im Darm zugrunde gegangen waren, diesen auf dem schnellsten Wege wieder verließen. Ein Beweis, daß es sich in diesem Fall nicht um eine normale, vorübergehende Infektion gehandelt haben kann, ist der, daß normale Infektionen in jedem Fall mit einer meist 3 Tage währenden Inkubationszeit begannen — einem Zeitraum, der unmöglich als Durchgangsdauer durch Magen und Dünndarm gedeutet werden kann — während hier stets nur am ersten Tag nach der Injektion die Blastozysten gefunden wurden.

Die Frage, wodurch der Verlust der Infektionsfähigkeit der Blastozysten in der Kultur zu erklären ist, dürfte so zu beantworten sein, daß die Blastozysten in der Kultur derartige Veränderungen durchmachen, daß sie unter den Bedingungen, wie sie im Darm herrschen, nicht mehr lebensfähig sind. Auf die Größenunterschiede zwischen Kultur- und Kotblastozysten ist schon oben kurz hingewiesen worden, Lavier (1936) beschrieb auch morphologische Abweichungen der Kulturform.

Unerklärlich bleibt fürs erste, daß Infektionen durch Injektion von Zökuminhalt infizierter Ratten in das Zökum nicht möglich waren; der Einwand, daß die Methodik nicht einwandfrei war, nämlich daß die Blastozysten durch den Ueberdruck, der während der Injizierung in der Spritze herrscht, zugrunde gehen, ist nicht stichhaltig, denn Kontrollkulturen, die mit der nach der Injektion in der Spritze verbliebenen Rest-Aufschwemmung angesetzt wurden, wurden 100proz. positiv.

Eindeutig scheint mir das Ergebnis zu sein, daß die menschlichen Blastozysten Typ I und II nicht auf Hunde übertragbar sind. Auch daß die menschlichen Blastozysten von Typ II und Typ III nicht auf Ratten übertragbar sind, dürfte, trotzdem nur je ein entsprechender Stamm geprüft wurde, erwiesen sein, zumal ich beide Blastozystis-Typen niemals in Ratten gefunden habe. Nicht völlig klar sind hingegen die Versuchsergebnisse der Uebertragung der menschlichen Blastozysten Typ I auf Ratten und der Rattenblastozystis auf Mäuse. Die Uebertragung eines menschlichen Blastozystis-Stammes von Typ I gelang bei 2 von 4 Ratten, je einmal in zwei getrennten Versuchen (im frischen und im 2 Tage alten Stuhl); hingegen gelang sie bei 2 anderen Blastozystis-Stämmen von Typ I nicht. Eine andauernde Infektion konnte aber auch im ersteren Falle bei beiden Ratten nicht erzielt werden. Zwei Möglichkeiten gibt es, diesen Befund zu erklären: entweder es handelt sich um eine Blastozystis, die ohne weiteres auf Ratten übertragbar ist, oder aber die mit dem Infektionsmaterial gefressene Begleitflora der Blastozysten ließ durch ihre Zusammensetzung eine vorübergehende Ansiedlung dieses Parasiten im Rattendarm unter sonst nicht zuträglichen Verhältnissen zu. Ich persönlich halte die letztere Ansicht für die richtige, denn im ersteren Fall wäre eine langandauernde Infektion, wie sie bei In-

fizierung der Ratten mit Rattenblastozysten zu beobachten war, zu erwarten gewesen. Endgültig ließ sich diese Frage aber nicht entscheiden, da der Träger dieses Blastozystis-Stammes, ein ambulanter Patient des Tropenkrankenhauses in Hamburg, nicht mehr zu erreichen war. Aehnlich dürfte sich auch der vorübergehend positive Uebertragungsversuch von Rattenblastozysten auf eine Maus erklären lassen, möglicherweise in diesem Fall dadurch bewirkt, daß die Maus eine verhältnismäßig große Menge Rattenkot gefressen hat. In keinem Fall berechtigen diese vorübergehend geglückten Uebertragungsversuche zu der Annahme, daß normalerweise eine Uebertragung von menschlichen Blastozysten Typ I auf die Ratte und von Rattenblastozysten auf die Maus möglich ist, daß also, mit anderen Worten, alle diese Blastozysten dieselbe Art sind.

Alles in allem haben also meine Infektionsversuche bewiesen, daß die Anschauung Alexeieffs (1911), nämlich, daß man nur eine Blastozystis-Art, Blastocystis enterocola Alexeieff, anzunehmen brauche, unrichtig ist.

Zusammenfassung.

1) Mit Blastozystis-Stämmen aus Ratte und Mensch wurden Infektionsversuche an Hunden, Ratten und weißen Mäusen angestellt.

2) Die Blastozysten verlieren unter gleichzeitiger morphologischer Veränderung in der Kultur sehr schnell ihre Infektionsfähigkeit.

3) Die menschlichen Blastozysten lassen sich nicht auf Hunde und Ratten, die Rattenblastozysten nicht auf Mäuse übertragen.

4) Bei der Infizierung von Ratten mit Rattenblastozysten zeigte sich, daß die Blastozysten normalerweise erst am 3. Tag nach der Infizierung im Kot erscheinen.

Schrifttum.

Alexeieff, A., C. r. Soc. Biol. **71**, 296 (1911). — Brumpt, E., Bull. Soc. Path. exot. Paris **5**, 725 (1912). — Lavier, M. G., C. r. Acad. Sci. Paris **205**, 340 (1937). — Reyer, W., Zbl. Bakter. I Orig. **138**, 241 (1938). — Ders., Arch. Protistenkde **92**, 226 (1939).

[Aus der Tropenabteilung des Instituts für parasitäre und Infektionskrankheiten der Reichsuniversität Utrecht (Direktor: Prof. Dr. L. de Blieck).]

Ueber die Fütterung von Mücken an Kanarienvögeln.

Von A. Bos und Otto Nieschulz.

Mit 2 Abbildungen im Text.

Um Mücken in Versuchen mit Vogelmalaria z. B. an Kanarienvögeln zum Saugen zu bringen, hat uns die folgende Methode recht brauchbare Ergebnisse geliefert.

Wir benutzten einen kleinen Käfig von etwa 8 cm Höhe und 9—10 cm Länge und Breite, der aus einem Rahmen von Eisendraht besteht. Die senkrecht verlaufenden Drähte sind nach oben und unten etwas über den eigent-

lichen Käfig hinaus verlängert. Der Boden und 3 Seitenwände sind mit Muckenstoff bekleidet, die 4. Wand trägt eine Aermelöffnung. Die Decke wird von einer Metallplatte gebildet, die mit Muttern auf den Käfig aufgeschraubt werden kann (Abb. 1).

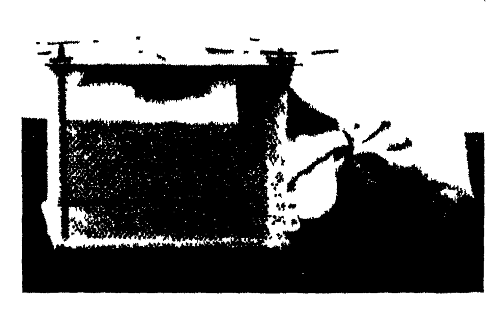


Abb. 1. Kafig zum Futtern von Mucken an Kanarienvogeln.

Der Kanarienvogel wird nun in einer Art Hängematte an der Unterseite der Decke fixiert (Abb. 2). Diese „Hängematte“ besteht aus einem schmalen Streifen Mückenstoff, mit 4 Löchern für Schnabel, einen entfederten Teil der Brust, Beine (die am besten mit einem Gazestreifen zusammenzubinden sind) und den Schwanz des Vogels. An den Seitenrändern des Streifens sind 2 längere Bänder angenäht und senkrecht auf diese noch je 2 kürzere Bänder. Die freien Enden dieser Bänder werden auf der Oberseite der Deckplatte verknotet. Außer dem Schwanz läßt man den Gazestreifen, mit dem die Füße des Tieres zusammengebunden sind, über den Käfigrand hinausragen und fixiert auf diese Weise auch die Beine. Der Kanarienvogel ist in seiner „Hängematte“ gut fixiert, ohne in der Atembewegung behindert zu sein, wenn die Bänder nicht zu stark angezogen sind. Hierauf ist besonders zu achten (vgl. Exp. 1 u. 2). Die Mücken haben auf dem entfederten Teil der Brust und den Beinen reichlich Gelegenheit, Blut aufzunehmen, und sie können durch den Vogel nicht gefressen oder beschädigt werden. Um die Mücken zurückzufangen, öffnen wir den Käfig durch Abnahme der Deckplatte in einem größeren Käfig.

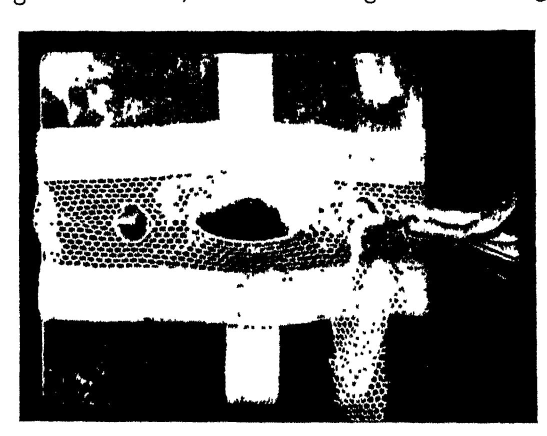


Abb. 2. Deckplatte des Kafigs von unten gesehen mit dem fixierten Kanarienvogel.

Einige Protokolle möchten wir als Beispiel der Versuche mit Culex pipiens geben, einer Mückenart, die als einigermaßen schwierig zu füttern gilt. Benutzt wurden überwinternde Exemplare, die zur Resorption der Fettkörper vor den Versuchen einige Tage im Warmzimmer gehalten wurden. Angesetzt wurden die Mücken gegen 17 Uhr und ihnen bis zum folgenden Morgen Gelegenheit zum Saugen gelassen.

Exp. 1. Von 101 Exemplaren von Culex pipiens, die 4 Tage im Warmzimmer bewahrt worden waren, hatten bis zum folgenden Morgen 79 oder 78 Proz. gesogen. Kanarienvogel gestorben, vielleicht zu fest angebunden.

Exp. 2. Von 31 C. pipiens (5 Tage im Warmzimmer bewahrt) alle Exemplare gesogen (100 Proz.). Kanarienvogel gestorben, zu fest angebunden.

Exp. 3. Von 33 C. pipiens (vorher 6 Tage im Warmzimmer) 31 oder 94 Proz. gesogen. Kanarienvogel ungeschädigt.

Exp. 4. Von 79 C. pipiens (nach 4 Tagen Warmzimmer) 72 oder 91 Proz. gesogen. Kanarienvogel gestorben, war aber nicht zu fest angebunden.

Exp. 5. Von 35 C. pipiens (nach 3 Tagen Warmzimmer) 28 oder 80 Proz. gesogen. Der Kanarienvogel, der 14 Tage vorher in Exp. 3 gebraucht worden war, wurde wieder nicht geschadigt.

Exp. 6. Von 45 C. pipiens (3 Tage Warmzimmer) 38 oder 84 Proz. gesogen. Vogel normal.

Exp. 7. Von 35 C. pipiens (vorher 3 Tage Warmzimmer und 2 Tage Zimmertemperatur) 23 oder 66 Proz. gesogen. Vogel normal.

In den hier erwähnten 7 Versuchen wurden 359 Exemplare von Culex pipiens gebraucht und von ihnen 302 oder 84 Proz. zum Saugen gebracht, ein Ergebnis, das als befriedigend zu betrachten ist. Die Versuche 3 und 5—7 zeigen, daß 30—40 Mücken gleichzeitig angesetzt werden können, ohne zu einer Schädigung des Vogels zu führen, während nach Exp. 4 über 70 Mücken zu viel Blut abnehmen.

Zusammenfassung.

Es wird eine Methode beschrieben, mit der Mücken (Culex pipiens) leicht auf Kanarienvögeln zum Saugen zu bringen sind. Gleichzeitig können 30—40 Mücken angesetzt werden, während eine größere Anzahl zu Schädigungen des Vogels führen kann.

[Aus dem Schüffner-Laboratorium des Instituts für tropische Hygiene in Amsterdam.]

Die Spaltung der klassischen Leptospira icterohaemorrhagiae s. icterogenes in zwei Biotypen.

Von R. Gispen und W. Schüffner.

Vom bakteriologischen Standpunkt aus gesehen, bilden die zahlreichen Arten und Rassen der Leptospiren, die als Krankheitserreger bei dem Menschen gefunden sind, eine sehr heterogene Gruppe. Vor allem in Japan, Indien und Australien kommen Leptospiren vor, die, soweit wir sie haben serologisch untersuchen können, wenig untereinander verwandt sind und weit von der kosmopolitischen Klassischen abstehen.

Für Europa liegen die Verhältnisse relativ einfach, wir haben es hier nur mit der weitverbreiteten klassischen Leptospire und ferner der L. canicola zu tun, die an den Hund gebunden wahrscheinlich nicht minder verbreitet ist, aber nur selten den Weg in den Menschen findet.

Drei andere Arten, deren Selbständigkeit durch streng lokales Auftreten gegeben ist, lassen wir hier aus dem Spiele. Es sind dies: 1. die L. grippotyphosa des Schlammfiebers, vor zwei Jahren von Rimpau und Schlossberger auch in Oberbayern gefunden, 2. eine in Niederländisch-Indien seit 1925 bekannte Art, L. Bataviae[1]), die von Mino — Vercelli —

[1]) Dazu gehören die Stämme „Swart" von Walch und Soesilo 1925, „Chinees" von Sardjito und „van Tienen" von Dinger 1932 in Batavia gezüchtet. Seitdem wird er dort regelmäßig beobachtet (Esseveld) und zwar bei Mensch und Ratte.

nun auch bei Reisbauern in Oberitalien gezuchtet wurde, und 3. ein vollkommen neuer Stamm „Sejro", den Borg-Petersen in Danemark bei Mensch und Maus (Mus spicilegus) entdeckt hat.

In der letzten Zeit nun ist es Petersen und uns moglich gewesen, die klassische Leptospire, die Ursache des reichlich in den Niederlanden und Dänemark vorkommenden „Weil", in zwei „Bio-Typen" zu spalten. Es war unserer Mitarbeiterin Frau Prof. Walch schon fruher aufgefallen, daß gewisse hier gezuchtete Stämme mit anderen, als homolog angesehenen Antiseren etwas unter dem Titer, der mit dem eigenen Stamm bei der Seroreaktion erhalten wurde, blieben. Solche kleine Abweichungen konnte man erklären durch die Annahme individueller Eigenschaften des Klons. Damit haben wir uns lange abgefunden. Es konnte sich aber auch in dem geringen und nicht regelmäßig erscheinenden Unterschied der Seroreaktion eine abweichende antigene Struktur verraten. Mit dem Aussprechen dieses Gedankens war auch der Weg gewiesen, auf dem man die Spur verfolgen konnte: die Absättigung nach Castellani.

Diese Methode hat uns bei der Leptospirenforschung zum ersten Male Dienst getan, als es darum ging, zwischen Canicola und klassischer Leptospire[1]) zu unterscheiden. Auch hier gab die einfache Seroreaktion (Agglutination und Lysis) nicht immer scharfe Ausschlage, und vor allem im Anfang der Immunkorperentwicklung wahrend der 2. Woche war der Titer gegen beide Arten häufig gleich hoch, so daß es in diesem Stadium unmoglich sein konnte, zu entscheiden, mit welcher Infektion man zu tun hatte. Die Absattigung lieferte in solchen Fällen eine klare Antwort. Lag eine echte Weilinfektion vor, dann zog die klassische Weil-Kultur sowohl die spezifischen Weil-, wie die aspezifischen Canicolaagglutinine heraus, und das Serum agglutinierte nun keinen der beiden Stamme mehr. Sattigte man das Serum mit der Canicolakultur ab, dann konnte diese nur die aspezifischen Agglutinine binden, das Serum behielt seine Reaktionskraft gegenuber der „Weil"-Leptospire. Umgekehrt war das Resultat, wenn eine Canicolainfektion vorlag. Der Absattigungsversuch wurde uns dadurch zu einer neuen Stütze für die selbständige Stellung der Canicola.

Der erste war Borg Petersen (Inst. von Prof. Madsen), der verdächtige Stämme gegeneinander dem Absättigungsversuch unterwarf. Auf dem Tropenkongreß in Amsterdam, September 1938, berichtete er über seine Befunde in der folgenden Weise: „Innerhalb solcher klassischen Stämme fanden wir 2 Untertypen, die sich dadurch unterscheiden, daß Stämme des einen Untertypus neben gemeinsamen Antigenen einen Antigenfaktor besitzen, den die Stämme des anderen Untertypus nicht haben. Dieser Unterschied kommt nur im Absättigungsversuch nach Ruys und Schüffner deutlich zum Ausdruck.... Es ist noch auszumachen, ob die Stämme innerhalb jedes Untertypus gegenseitig identisch sind, sowie ob andere Unterschiede zwischen den Untertypen bestehen, z. B. in der Pathogenität." Seine Resultate konnten in Amsterdam vollkommen bestätigt werden, und zwar zunächst an den beiden uns bereits bekannten und in ihrem Verhältnis zueinander nicht einwandfrei erschienenen Stämmen. Sättigt man das Antiserum „Wijnberg" (ein von uns viel gebrauchter Stamm, den wir im Jahre 1925 aus einem schweren, aber genesenen Fall züchteten) mit dem uns auch gut bekannten Stamm „Kantorowicz" (1931) ab, dann agglutiniert[2]) das zurückbleibende Serum den Stamm „Wijnberg" nach wie vor, aber nicht mehr, oder weit unter dem Titer bleibend, den Stamm Kantorowicz. Nimmt man nun das Antiserum „Kantorowicz" und sättigt dieses mit „Wijnberg" ab, dann werden dem Serum alle spezifischen Agglutinine entzogen, mit anderen Worten: das zurückbleibende Serum agglutiniert weder „Wijnberg", noch den eigenen Stamm (Tabelle I).

1) Ruys und Schüffner, Nederl. Tijdschr. Geneesk. 1934, S. 3110—3114.
2) sc.: lysiert, zur Abkürzung!

Tabelle I.

Stamm	Antiserum von Wijnberg	Antiserum von Wijnberg nach Absattigung mit Kantorowicz-Kultur
Wijnberg reagiert bis	30 000	bis 30 000
Kantorowicz „ „	> 10 000	—
	Kantorowicz	Kantorowicz nach Absattigung mit Wijnberg-Kultur
Wijnberg reagiert bis	30 000	—
Kantorowicz „ „	30 000	—

Hieraus geht hervor, daß „Wijnberg“ einmal den gleichen antigenen Komplex wie „Kantorowicz“ besitzt, aber außerdem noch ein zweites Antigen, das im Aufbau des Stammes Kantorowicz **nicht** vorkommt. Machen wir von einer Vorstellungsweise Gebrauch, deren man sich in der Bakteriologie (bei den Salmonellosen z. B.) mehr bedient, dann würde der gemeinsame Komponent mit A zu bezeichnen sein und der allein dem Stamm „Wijnberg“ Eigene mit B.

„Wijnberg“ besitzt dann AB, Kantorowicz allein A. Das bedeutet also, daß die klassische „Weilsche Krankheit“ von zwei Biotypen Leptospiren verursacht wird, von einer vollständigen, entsprechend dem Stamm „Wijnberg“ und einer unvollständigen, entsprechend „Kantorowicz“.

Tabelle IIa.
Erste Serie.

Klassische Stamme		Gezüchtet im Jahr	Agglutination mit Serum Wijnberg	Agglutination mit Serum Wijnberg nach Absättigung durch Kantorowicz-Kultur
des vollständigen Typus				
1. Wijnberg	(Niederland)	1925	30 000	30 000
2. Wegener	„	1938	30 000	10 000
3. rat 471	„	1938	30 000	10 000
4. Wismar	(Deutschland)	1921	30 000	30 000
5. Lisboa	(Portugal)	1932	30 000	30 000
6. M. 20	(Danemark)	1935	> 10 000	10 000
7. M. 1	(Norwegen)	1937	30 000	10 000
8. Jackson	(England)	1931	30 000	10 000
9. Duggan	(Australien)	1937	30 000	30 000
10. Chopra	(Kalkutta)	1938	30 000	10 000
des unvollständigen Typus				
1. Kantorowicz	(Niederland)	1931	> 10 000	—
2. Franken	„	1925	10 000	—
3. v. Vliet	„	1938	10 000	—
4. rat 480	„	1938	10 000	—
5. big Utrecht	„	1937	30 000	—
6. Berlijn = R.G.A.		1915	10 000	—
7. Verdun	(Frankreich)	1916	30 000	—
8. Hickey	(England)	1936	30 000	—
9. M. Zweden	(Schweden)	1937	10 000	—
10. Semarang	(Niederl. Indien)	?	> 10 000	—
11. Segi	„ „	?	30 000	—
12. Uchida	(Japan)	?	10 000	—
13. Sciroka	„	?	10 000	—
14. rat 23	„	?	10 000	—

Wir betrachten die beiden Antigene A und B, wie wir sie in den beiden Biotypen einzeln oder nebeneinander finden, als vollwertig. Dagegen haben wir über die Art der unspezifischen Rezeptoren, die in einem Antiserum zur Mitagglutination eines heterologen Stammes Anlaß geben (z. B. klassisches Antiserum, das Canicola mitagglutiniert), noch keine Vorstellung. Allein wenn man sieht, mit welchem Vorsprung diese unspezifischen Antikörper vor den spezifischen erscheinen, und wie sie dann auch rasch wieder verschwinden, dann kann man sich des Gedankens nicht erwehren, daß man es hier mit qualitativ verschiedenen Prozessen zu tun hat. Vielleicht gelingt es durch Heranziehen des Prinzipes der H- und O-Agglutination, wie es Frau Prof. Walch hier begonnen hat, unsere Einsicht zu vertiefen. Die sehr interessanten Reaktionen mit alkoholischen Extrakten, die Carlinfanti[1]) im Laboratorium von Schlossberger anstellte, haben für diesen Zweck keine Bedeutung. Das war auch nicht die Absicht. Durch sie wird vielmehr erwiesen, daß der gesamten Leptospirengruppe ein besonderer Lipoidkörper gemeinsam ist.

Aus technischen Gründen konnten wir früher die Agglutinationsreihe nach der Absättigung erst mit einer Serumverdünnung von 1:1000 beginnen lassen (siehe „Technik des Absättigungsversuchs" in diesem Zentralblatt).

Die Tabelle IIa wurde auf diese Weise gewonnen. Ueber die Verdünnungen unter 1:1000 ist hier nur bei einigen etwas bekannt.

Tabelle IIb.
Zweite Serie.

Klassische Stämme		Gezüchtet im Jahr	Agglutination mit Serum Wijnberg	Agglutination mit Serum Wijnberg nach Absättigung durch Kantorowicz-Kultur
des vollständigen Typus				
1. Wijnberg	(Niederland)	1925	3000	3000
2. Zaan	,,	1924	3000	> 3000
3. Moné	,,	1927	3000	3000
4. rat Amsterdam 524	,,	1939	> 3000	3000
5. rat Amsterdam 529	,,	1939	> 3000	3000
6. rat Amsterdam 544	,,	1939	3000	3000
7. Ball Prof. Mino	(Italien)	1938	3000	1000
8. CO Prof. Mino	,,	1938	> 3000	1000
9. Gelb-Fieber G. 6	(U.S.A.)	1927	3000	3000
10. City D	,,	1937	3000	3000
11. Mukkerjee	(Brit. Indien)	1939	3000	> 1000
des unvollständigen Biotypus				
1. Kantorowicz	(Niederland)	1931	> 1000	—
2. Konings	,,	1937	3000	—
3. Griffioen	,,	1938	1000	—
4. Niemeijer	,,	1938	1000	—
5. v. d. Wulp	,,	1938	1000	—
6. Marcus	,,	1938	1000	—
7. rat Rotterdam 488	,,	1938	1000	—
8. rat Amsterdam 525	,,	1939	> 1000	—
9. rat Amsterdam 528	,,	1939	1000	—
10. rat Amsterdam 531	,,	1939	> 1000	—
11. rat Amsterdam 540	,,	1939	3000	—
12. rat Amsterdam 541	,,	1939	1000	—
13. rat Amsterdam 548	,,	1939	3000	—
14. rat Amsterdam 550	,,	1939	3000	—
15. rat Amsterdam 551	,,	1939	3000	—
16. Kawauchi	(Japan)	1938	1000	—

Die Tabelle IIb gibt die Resultate nach unserer neueren vereinfachten Methodik wieder, wobei von einem Antiserum mit dem Titer von 1:3000 ausgegangen wurde. Hierbei kann die Reihe der Agglutinationen nach unten bis zur Verdünnung von 1:20 verlängert werden. Aber auch dann wurde das gleichförmig negative Resultat der unvollständigen Biotype nicht durch schwache Restagglutinationen gestört.

1) E. Carlinfanti, Studien über die antigenen Eigenschaften der Spirochaeta icterohaemorrhagiae. Z. f. Im. Bd. 94, 1938, S. 326/36.

Wir haben nun eine Anzahl klassischer Stämme, die wir zur Zeit anhielten, auf ihre Zugehörigkeit zu der einen oder anderen Biotype geprüft. Es war dann nur nötig, Antiserum Wijnberg mit Kantorowicz-Kultur abzusättigen und dann mit diesem Testserum, das nur noch mit der B-Komponente beladen war, den Agglutinationsversuch anzusetzen. Die zu den Unvollständigen gehörenden Stämme agglutinierten dann nicht oder nicht nennenswert, die vollständigen Stämme dagegen erreichten den ursprünglichen Titer. Die Resultate sind in den Tabellen IIa und b enthalten, wobei in den ersten Reihen die Reaktionswerte vor, in der zweiten nach der Absättigung stehen.

Verschiedenes fällt in diesen Tabellen auf. Zunächst die beiden ältesten europäischen Stämme, R.G.A. und Verdun. R.G.A. (von uns auch Berlin genannt), ist der erste 1915 in Europa von Uhlenhuth und Fromme gezüchtete Stamm, den Schüffner 1924 von Manteufel aus dem Reichsgesundheitsamt erhielt. „Verdun" stammt aus dem Jahre 1916. Beide Stämme rühren von Frontkämpfern her, beide gehören zur Gruppe der Unvollständigen. Dasselbe gilt von den japanischen Stämmen, die wir Prof. Mitsaoka verdanken. Leider konnen wir uns nicht über die ersten japanischen Stämme von Ido und Inada aussprechen, da wir sie nicht besitzen. Die beiden Niederländisch-Indischen Stämme erwiesen sich als Unvollständige. Aus Australien (Dr. Derrick — Dr. Sawers) und Kalkutta (Prof. Das Gupta) erhielten wir aber Vollständige.

Unter unseren vielen heimischen Stämmen kommen beide Gruppen vor, und zwar gleichgültig, ob sie von Menschen oder Ratten gewonnen wurden. Ein Schweinestamm „big" Utrecht (Prof. Klarenbeek) war ein Unvollständiger; von Hunden hatten wir leider keine klassischen Stämme in der Sammlung. Nur B. Petersen konnte bisher einen solchen untersuchen und als Vollständigen erkennen (mündliche Mitteilung). Die ausführliche Untersuchung, die besonderes Interesse hat, da der Hund zugleich der Träger der Canicola ist, steht also noch aus.

In Abwartung weiterer Ergebnisse meinen wir heute sagen zu dürfen, daß die beiden Biotypen nebeneinander bestehen, und daß sich weder, was den Ort, noch den Träger betrifft, irgendwelche Grenzlinien ziehen lassen. Ebensowenig scheint die Klinik von dem Typus beeinflußt zu werden, Ikterus kommt bei beiden vor. Aber selbst wenn sich bei weiteren Untersuchungen in dieser Richtung Eigenheiten ergeben sollten — auffallend können sie nicht sein —, auch dann würden wir dabei bleiben, die beiden Biotypen als Leptospiren des klassischen „Weil" unter der Art L. icterohaemorrhagiae s. icterogenes zusammenzufassen, und zwar auf Grund ihrer gleichen Epidemiologie (unter Ratten gleich verbreitet) und auf Grund ihrer besonderen großen Verwandtschaft in antigener Struktur.

Der Absättigungsversuch fällt bei unsern beiden Biotypen, wie wir sahen, asymmetrisch aus. Wirklich heterologe Leptospiren, wie die klassische gegenüber dem Schlammfieber, oder sich Näherstehende, wie die klassische und die Canicola, geben ein symmetrisches Bild (Tab. III), das einen Abstand höherer Ordnung kennzeichnet. Hierdurch haben sie als „Arten" Anspruch

Tabelle III.

Stamm	Antiserum von	
	Wijnberg	dasselbe nach Absättigung durch Canicola-Kultur
Wijnberg reagiert bis Canicola „ „	30 000 3 000	30 000 —
	Canicola	dasselbe nach Absättigung durch Wijnberg-Kultur
Wijnberg reagiert bis Canicola „ „	1 000 30 000	— 30 000

auf eine selbständige Stellung neben der L. icterohaemorrhagiae. Den beiden „Biotypen“ des klassischen Weils mit ihrer prinzipiell abweichenden antigenen Struktur können wir nur einen untergeordneten Platz einräumen[1]).

Bei einer Anzahl heterologer Leptospiren fällt dann noch die Zugehörigkeit zu einem bestimmten Träger in die Waagschale, L. hebdomadis zu Microtus montebelli
L. canicola zum Hund
L. autumnalis zur Apodemus speciosus
L. Sejro zur Mus spicilegus (neu!)
L. 90 C zur Vespertilio (neu!)
L. javanica zur Mus brevicaudatus.

Gegen einen Einwand müssen wir uns noch kehren. Man könnte meinen, daß der Ausfall des B-Antigens bei der Kantorowicz-Gruppe eine Funktion der Zeit sei, eine Folge des langdauernden Fortzüchtens auf künstlichem Nährboden (Adaption nach Van Loghem). Durch die beigefügten Jahreszahlen wird die Vermutung bereits einigermaßen widerlegt, wenn auch gerade die ältesten Stämme zum unvollständigen Biotypus gehören. Aber auch sonst haben sich dafür keinerlei Beweise finden lassen. Im abgelaufenen Jahre konnten wir wiederholt frische Stämme isolieren, die sich schon nach erster Passage als Unvollständige verrieten. Auch vermissen wir jegliche Zwischenformen, die man bei schwachem serologischem Charakter erwarten müßte. Man findet entweder Stämme mit dem Faktor B oder solche, die ihn missen. Es sind eben nicht die Stämme, die sich ändern, sondern der Stand unseres Wissens!

Beiläufig sei noch mitgeteilt, daß wir bei der japanischen L. autumnalis (Akiyami A) und dem indischen Stamm Rachmat das gleiche Verhältnis von vollständiger zu unvollständiger Biotype gefunden haben.

Welchen Einfluß hat nun die genauere Kenntnis des klassischen Weil-Erregers auf unser Arbeiten? In der Hauptsache ist es die Diagnose, die hierdurch einen Fortschritt erfährt. Das folgende Beispiel, eins der ersten, wird dies verdeutlichen.

Das Serum von Patient Z mit Verdacht auf Weil reagierte den 17. Krankheitstag mit L. canicola bis 1/10000 und mit L. icterohaemorrhagiae (Stamm Wijnberg) nur bis 1/1000. Dies sprach daher für eine Canicola-Infektion. Dank dem behandelnden Arzt glückte es, aus dem Urin vom 22. Tag die schuldige Leptospire zu züchten, dies war aber — gegen Erwartung — nicht die Canicola, sondern ein klassischer Weilstamm, und zwar die unvollständige Biotype. Drei Monate später konnte das Serum noch einmal untersucht werden. Nun war der Titer der Agglutination mit L. canicola stark gesunken, auf 1/1000, der gegen „Wijnberg“ dagegen gleich geblieben. Die nun vorgenommene Reaktion mit „Kantorowicz“, der unvollständigen Biotype, ergab den höheren Titer, nämlich 1/3000. Das kam überein mit dem, was die Untersuchung des Stammes bereits gelehrt hatte, und klärte die Sachlage.

Das Beispiel ist noch in anderen Hinsichten lehrreich. Einmal die Wahrnehmung, daß am 17. Tage eine so hohe aspezifische Agglutination (mit Canicola) auftritt. Wir haben das öfters beobachtet, bisweilen noch früher

---

1) Wir sind uns bewußt, daß die Bezeichnungen, die wir gebrauchen, „Biotype“ gegenüber „Art“, letzten Endes nur Worte sind, wie sie sich zu rechter Zeit einstellen! Wir hätten auch andere wählen können, subspecies und species, Art und Rasse. Wir wären aber auch damit nicht weiter gekommen, da über die strenge Definition aller dieser Ausdrücke die Meinungen immer noch auseinander gehen, besonders wenn es sich um Mikroorganismen handelt. Und doch sind die Bezeichnungen Biotype und Art nicht willkürlich gewählt, wir verbinden mit ihnen einen doppelten Sinn: 1. daß bei beiden die genetisch bedingten Eigenschaften als unveränderliche betrachtet werden müssen (wir vermeiden darum Worte wie Varietat, Modifikation, Type), und 2. daß der Titel „Art“ die Ueberordnung über die Biotype in sich schließt.

in der Krankheit, in einer Zeit, wo die spezifischen Agglutinine kaum gebildet waren, jedenfalls noch kaum eine Reaktion gaben. Mit diesem „vorlauten" Steigen einer aspezifischen Reaktion scheint nach unserer Erfahrung auch ein verfrühtes rasches Fallen zusammen zugehen; die spezifischen Antistoffe dagegen, die später erscheinen, bleiben nun auch viel länger auf voller Höhe. An diesem Verlauf hat man also ein Mittel, um in zweifelhaften Fällen noch nach Monaten festzustellen, mit welcher Leptospire, Canicola oder klassischer Leptospire und dann selbst mit welchem Typus der Kranke infiziert war.

Als zweites lehrt uns die Erfahrung, daß vor allem Infektionen der Kantorowicz-Gruppe zu verfrühter aspezifischer Reaktion mit Canicola zu neigen scheinen (Tabelle IV).

Tabelle IV.

Krankheitsfalle, verursacht durch die unvollständige Biotype.

Serum von	Krankheitstag	Agglutination mit L. icterohaemorrhagiae s. icterogenes: A + B-Biotype	Agglutination mit L. icterohaemorrhagiae s. icterogenes: A-Biotype	Agglutination mit L. canicola
M (407)	17	1000	3000	10 000
Gr (397)	13	100		1 000
A (399)	29	3000		10 000
Br (188)	12			30 000

Bei den in der Tabelle IV verzeichneten 4 Fällen, die durch Züchtung der Stämme als Unvollständige gesichert wurden, leitete die hohe Reaktion mit Canicola die Diagnose anfangs auf eine Fehlspur. Die vollständige Biotype lieferte keine dergleichen Fälle. Darnach zu urteilen, handelt es sich hier um eine gewisse Gesetzmäßigkeit. Es ist daher möglich, daß die Wahrnehmung einer abnorm hohen Agglutination der Canicola im Anfang der Krankheit als Andeutung dafür angesehen werden darf, daß eine Infektion mit der Biotype A vorliegt.

Mehr Bedeutung für die Praxis kommt auf den ersten Blick der Frage zu, ob es nötig ist, beim Geben von Heilserum (von Rekonvaleszenten gewonnen) mit dem Typus zu rechnen. Theoretisch wird man die Frage bejahen müssen, aber das einzuhalten, scheitert bereits daran, daß man zur Zeit der Indikation für die Serumtherapie, selbst wenn man über ein gut eingearbeitetes Laboratorium verfügt, kaum die Leptospire gesehen hat, geschweige denn ihre Art oder Biotype kennt. Man wird daher nehmen, was man hat, und das um so mehr, da nach unserer Erfahrung die bakteriziden Stoffe auch ferner verwandter Stämme weit übereinander liegen. Doch würden wir empfehlen, für die Herstellung von Weil-Heilserum bei Tieren nicht nur die vollständige Biotype, sondern beide zu gebrauchen, sei es denn auch allein aus rein theoretischen Gründen. Ein solches „polyvalentes" Serum s. str. würde für den größten Teil von Europa, wo nur die klassische Leptospire Todesfälle verursacht, ausreichend sein. In Indien, wo mehrere Arten lebensgefährlich werden können, hat man Mischantisera nötig.

Zusammenfassung.

Die von Borg Petersen (Kopenhagen, Prof. Madsen) gefundene Aufteilung der klassischen Weilstämme in zwei Biotypen wird bestätigt. Nach Untersuchung einer größeren Reihe von Stämmen scheint es, daß die beiden Biotypen — eine Vollständige mit den Antigenen A + B und eine Un-

vollständige allein mit A — bei Menschen und Ratten gleichmäßig verteilt vorkommen. Die zwei ältesten in Europa an der Westfront während des Krieges gezüchteten Stämme gehören der unvollständigen Form an. Fur die Serodiagnostik der Weilschen Krankheit ergibt sich hieraus die Notwendigkeit, den Agglutinationsversuch stets mit beiden Biotypen anzusetzen.

Das gleiche Verhältnis von vollständiger und unvollständiger Biotype wurde von uns zwischen der L. autumnalis--Akiyami A und dem indischen Stamm „Rachmat“ festgestellt.

Nachdruck verboten.

[Aus dem Tropeninstitut Amsterdam (Direktor: Prof. E. P. Snijders).]

Zur Technik des Absättigungsversuchs mit Leptospiren.

Von W. Schüffner und H. Bohlander.

Mit 4 Abbildungen im Text.

Die Analyse der verschiedenen Arten und Biotypen der Leptospiren ist durch die Castellanische Methode der Absättigung wesentlich gefördert worden. Ohne sie hätte man u. a. nie die klare Einsicht in die Verhältnisse erhalten, die unter den klassischen „Weil“-Stämmen bestehen, nämlich, daß die klassische L. icterohaemorrhagiae s. icterogenes keine einheitliche Art ist, sondern in zwei Biotypen auseinanderfällt.

Während die Methode für Bakterien längst ausgearbeitet ist, und in jedem Laboratorium routinemäßig ausgeübt wird, stieß ihre Anwendung bei Leptospiren auf mancherlei Schwierigkeiten, die ein Einbürgern der Methode verhinderten. Der Grund hierfür liegt zunächst darin, daß man zur Absättigung viel und dicht gewachsene Kultur braucht, und ferner, daß das Abzentrifugieren der Leptospiren, die sich mit den passenden Rezeptoren beladen mußten, an die Geduld des Arbeiters und die Leistungsfähigkeit der Zentrifuge große Anforderungen stellt. Das spezifische Gewicht der Leptospire weicht scheinbar so wenig von dem der Nährflüssigkeit (in der Hauptsache 10proz. Kaninchenserum) ab, daß das Ausschleudern nur sehr langsam geht. Das gilt selbst für formalinisierte Kulturen; lebende Leptospiren halten sich noch länger in der Flüssigkeit treibend. Im letzten Jahr nun haben wir das Verfahren auf folgende Weise vereinfacht und dadurch abgekürzt.

Der technische Anteil dieser Verbesserung kommt einer handlichen Zentrifuge (Marke Ecco) zu, die es im Gegensatz zu den gewöhnlich in Laboratorien zur Verfügung stehenden mit 3000—3500 ∞, bis auf 16000 ∞ bringt. Hiermit wurde die Zeit für restloses Ausschleudern von 3—5 Std. auf etwa ¼ Std. herabgesetzt, wenn die Höhe der Flüssigkeitssäule etwa 5—6 cm betrug. Allerdings hatten wir hierbei trotz sorgfältigstem Gewichtsausgleich

und vorschriftsmäßiger Lagerung viel ärgerliche Verluste durch Zertrümmerung der Röhrchen. Systematische Versuche lehrten indessen, daß es nicht nötig war, die Zentrifuge auf das äußerste anzustrengen, und daß selbst mit 10000 ∞ ein vollkommenes Ausschleudern in nur wenig längerer Zeit, 20 Min., erreicht werden konnte. Zeitersparnis (statt 3–5 Std. nur 20 Min.), Vermeidung von Bruch, und Schonung der immerhin kostbaren Zentrifuge waren die drei Vorteile, die uns diese Technik einbrachte.

Nicht minder wurde die Methode durch günstigere Gestaltung der Misch- und Mengenverhältnisse gefördert. Wir gehen jetzt von Antiseren mit einem Titer von 3000 aus. War der beim Kaninchen erreichte Titer höher, wie es gewöhnlich der Fall ist, dann wird das Serum bis zur gewünschten Höhe (1 : 3000) verdünnt. Handelt es sich um Patientensera die unter dieser Grenze blieben, dann muß man sich eben mit niedrigeren Werten zufriedengeben. Die Grenze des möglichen liegt bei einem Titer von 1 : 300, darunter mit dem Absättigungsversuch zu gehen, ist zwecklos.

Der Vorteil der Standardisierung des Serums ist ein dreifacher. 1. Man erhält vergleichbare Werte, 2. man braucht bei der Austitrierung der zurückgebliebenen Agglutinine stets nur bis zur Verdünnung 1 : 3000 zu gehen, und 3. man kann von vornherein annähernd bestimmen, wieviel Kultur man zur Absättigung nötig hat.

Man verfährt dann folgendermaßen. Von dem auf seinen Wert 1:3000 eingestellten Antiserum wird ein Tropfen aus grober Pipette mit 9 Tropfen konzentrierter Kultur gemischt. Abgemessen sind die Mengen genau 0,05 ccm Serum + 0,45 ccm Kulturkonzentrat. Um dies letztere zu erhalten, ist nicht minder als 25 ccm gut gewachsene, mit 0,5proz. Formalin abgetötete Kultur nötig, die in der obigen Weise zentrifugiert und dann abpipettiert wurde! Zu diesem überraschenden Mengenverhältnis sind wir erfahrungsmäßig gekommen. Das Kriterium für die erforderliche Kulturmenge war der Punkt, bei dem die Absättigung eine vollkommene wurde. Hätten wir bloße Kultur verwandt, wie wir es im Anfang[1]) taten, dann hätte der eine Tropfen Serum mit 500 Tropfen Kultur abgesättigt werden müssen! Das hatte den großen Nachteil, daß nun die erste Verdünnung des Agglutinationsversuchs erst mit einem Titer von 1:1000 beginnen konnte. Durch Einengen der Kultur dagegen wird die Verdünnung des Serums auf nur 1:10 herabgesetzt, der erste Agglutinationsversuch kann also, wenn man will, einen Titer von 1:20 haben[2]). Nun sind auch die oft niedrig titrierten Patientensera der Methode zugänglich: der große Vorteil der Konzentration

In einem Punkt bleibt allerdings noch Unsicherheit, das ist die Dichtheit der Kultur, die nur im Dunkelfeld beurteilt werden kann. In einem Laboratorium, wo man routinemäßig mit Leptospiren arbeitet, stellt sich die Beurteilung einigermaßen sicher ein, so daß man mit der einmal errechneten Menge der Kultur meist das richtige Quantum treffen wird. Aber Uebereinstimmung zwischen verschiedenen Laboratorien wird sich schwerer erreichen lassen, obwohl natürlich eine Einregulierung, d. h. bestimmen, wieviel Kultur man zur Absättigung nötig hat, für jedes Laboratorium ausführbar ist.

Man überläßt nun Leptospiren und Antiserum dem Bindungsprozeß. Dafür bleiben die Röhrchen bei uns über Nacht stehen. Diese Frist hängt mit unserer Arbeitseinteilung zusammen und ist reichlich lang; durch syste-

---

1) Ruys und Schüffner, Nederl. Tijdschr. Geneesk. 1934, S. 3110–3114.

2) 1:20 wird in Wirklichkeit erreicht, wenn das Antiserum ursprünglich nicht höher als 1:3000 gestiegen war. Hätte es verdünnt werden müssen um es auf 1:3000 zu bringen, dann wäre der Titer 1:20 eigentlich ein entsprechend höherer. Wir haben diese Verschiebung jedoch außer acht gelassen, wie wir glauben, ohne das Resultat zu beeinträchtigen.

matische Versuche ermittelten wir, daß die Bindung nach einer Stunde schon zu $^9/_{10}$, nach 4 Std. so gut als ganz abgeschlossen ist. Für das Abzentrifugieren der beladenen Leptospiren hat man bei der kleinen Menge, ca. 0,5 ccm mit einer niedrigen Flüssigkeitssäule, nicht mehr als 5 Min. nötig.

Nach dieser Vorbereitung wird mit dem Antiserum, das um einen Teil seiner Antikörper ärmer geworden sein kann, der Agglutinationsversuch in der gewöhnlichen Weise vorgenommen, die hier kurz wiedergegeben werden möge.

Wir benutzen dazu auch heute noch die im Handel befindlichen Farbnäpfe (Fa. Günther und Wagner-Hannover)[1]). In den 24 Facetten eines Napfes kann man leicht die Reihe der Verdünnungen bis 1 : 300000 unterbringen. Unsere frühere 10-Tropfen-Methode, mit der man auf einfache Weise fallende Verdünnungen im Rhythmus von 1 : 10, 25, 50, 100 usw. erhält, haben wir zugunsten der 6-Tropfen-Methode mit dem Rhythmus 1 : 10, 30, 100 usw. aufgegeben. Die Gefahr, daß unter den größeren Sprüngen die Genauigkeit des Resultates leiden könnte, besteht nach unserer Erfahrung nicht. Bei kleinen Intervallen, die wohl nach sorgfältigerer Arbeit aussehen könnten, macht das Ablesen, das im Dunkelfeld geschehen muß, größere Schwierigkeit, während die großen Sprünge die Entscheidung, ob eine Reaktion noch positiv ist oder nicht, erleichtern, und so dem Ablesen eine größere Objektivität sichern.

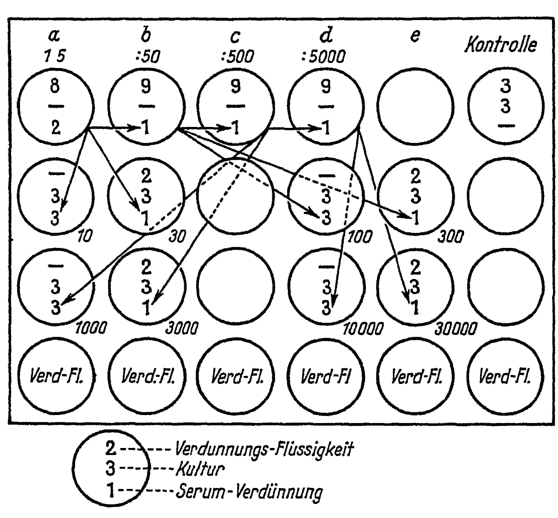


Abb. 1. Schema A.

In den folgenden Schemata ist der Verlauf des Versuchs aufgenommen. **Schema A** enthält die verschiedenen Phasen, wie sie bei gewöhnlicher Prüfung eines Serums auf Agglutinine und Lysine einander folgen. In die oberste Reihe kommen die Stammverdünnungen, in die darauffolgenden die eigentlichen Reaktionen. Das Beschicken der Näpfchen geschieht in einer bestimmten Reihenfolge, wobei man stets mit der gleichen fein ausgezogenen Pipette arbeitet, um die gleiche Größe des Tropfens zu sichern. (Die Tropfenzahl pro ccm kann bei diesen Pipetten zwischen 42 und 80 wechseln.)

Man beginnt mit dem Einträufeln der Verdünnungsflüssigkeit (Vervoortsche 1prom. Peptonlösung, durch Zufügen von 10 Proz. Sörrensenschem Phosphatgemisch auf p_H 7,0 gebracht). Dann wird in die Reihen der eigentlichen Reaktion und in das Kontrollnäpfchen die formalinisierte Kultur gegeben, jedesmal 3 Tropfen.

Als Drittes endlich das zu untersuchende Serum, nachdem man zuvor die Pipette mit Verdünnungsflüssigkeit ausgespült hat[2]). Das erste Näpfchen *a*

1) Schüffner und Mochtar, Zbl. Bakter. I Orig. **101**, 406.

2) Eventuell kann nach diesem Handgriff die Pipette durch gründliches Erhitzen sterilisiert werden, die feine Spitze wird nur rasch durch die Flamme gezogen. Gewöhnlich

erhält 2 Tropfen des unverdünnten Serums. Erneutes Ausspülen der Pipette! Danach den gesamten Inhalt des ersten Näpfchens mehrmals aufsaugen und ausspritzen, um eine vollkommene Mischung zu erreichen. Verteilen des nun verdünnten (1 : 5) Serums: 1 Tropfen zur Herstellung der folgenden Stammverdünnung b, 3 Tropfen für die erste Reaktion (1 : 10) und 1 Tropfen für die zweite (1 : 30). Ausspülen der Pipette, und in derselben Weise das Näpfchen *b* (1 : 50) behandeln, mit dessen Verdünnung man die Reaktionen 1 : 100 und 1 : 300 ansetzt usw., bis man zu der Verdünnung gelangt, in deren Nähe man das Ende der Reaktion erwartet. Die Näpfchen mit den Stammlösungen des Serums enthalten je 10 Tropfen, die Reihen der Reaktion je 6 Tropfen.

Zum Abschluß nimmt man das Mischen der Verdünnungen vor, wie oben beschrieben. Man beginnt mit dem letzten Näpfchen, und setzt das der Reihe nach, also rückläufig, fort bis zur 1. Verdünnung; dadurch wird ein jedesmaliges Ausspülen der Pipette unnötig, man geht ja stets von der schwächeren Verdünnung in die stärkere. Bei umgekehrtem Gang würde man leicht die Konzentration des Serums ändern können.

Das ganze Arbeiten ist auf kleinste Mengen und ein schnelles Tempo eingestellt. Eingeübtes Personal gebraucht für einen Versuch (ein Serum und ein Leptospirenstamm, bis zum Titer 1 : 30000) etwa 3 Minuten.

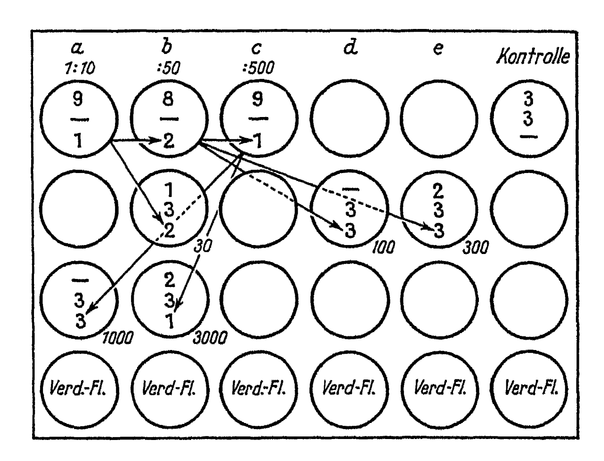


Abb. 2. Schema B.

Schema B bezieht sich auf den Agglutinationsversuch nach der Absättigung. Es ist ein verkürztes Verfahren, das stets mit einer Verdünnung von 1 : 3000 endigt (s. oben); im übrigen gelten dieselben Regeln. Da das abgesättigte Serum im Näpfchen a bereits eine Verdünnung von 1 : 10 mitbringt, beginnt der eigentliche Versuch erst im zweiten Näpfchen der zweiten Reihe mit 1 : 30; es empfing 2 Tropfen des Serums in a. Alles andere wie oben.

Man bringt nun die aufeinandergesetzten Näpfe unter eine feucht gehaltene Glasglocke, um das Austrocknen zu verhindern. Mit dem Ablesen der Resultate kann man bei der langsamer reagierenden formalinisierten Kultur nach 4 Stunden beginnen. Wir erinnern daran, daß man die Tröpfchen, die man mit der Platinöse entnimmt, ohne Deckglas (Objektiv C) im Dunkelfeld untersucht, und daß man denselben Objektträger für zahlreiche Tröpfchen benutzen kann (s. Abb. 3). Das erspart das jeweilige Einstellen des Kondensors auf die Dicke des Objektträgers. Ein weiterer kleiner Kunstgriff bei der mikroskopischen Kontrolle ist das Aus-

---

sammelt sich im Conus etwas Kondenswasser. und wenn dieses erhitzt wird, zieht es als ein feiner Dampfstrahl aus der Spitze ab; auch das trägt dazu bei, alles Lebende in der Spitze abzutöten. Dieser kleine Zwischenakt empfiehlt sich, wenn man das Serum, mit dem die Pipette nun in Berührung kommt, steril aufbewahren will. — Die Spülflüssigkeit wird in die 6 Näpfchen der untersten Reihe gefüllt.

schlagen des Objektivs, womit man den Lichtpunkt des Dunkelfeldes sichtbar macht. Auf diesen zentralen Punkt des weitergeschobenen Objektträgers wird dann der neue Tropfen deponiert. Nun schlägt man das Objektiv zurück, das Bild ist dann sofort scharf eingestellt. Alle diese an sich unbedeutenden Verbesserungen haben dazu beigetragen, die Leptospirenuntersuchung im großen Maßstabe möglich zu machen, und vor allem den Absättigungsversuch in eine brauchbare Form zu bringen.

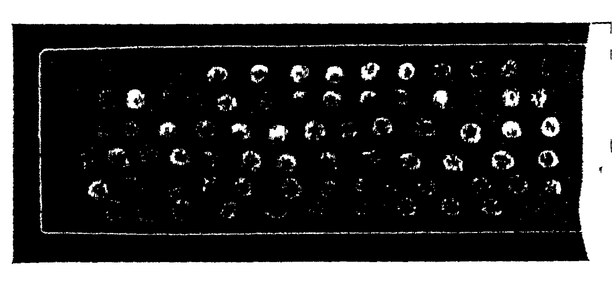
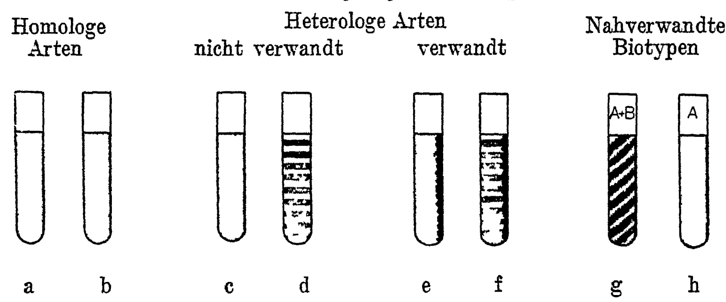


Abb. 3.

In der folgenden Graphik ist versucht, von dem, was man mit der Methode erreicht, eine übersichtliche Vorstellung zu geben. Der Versuch fällt verschieden aus, je nachdem man es mit homologen, heterologen oder nahe verwandten Stämmen zu tun hat.

Schema der Absättigungen bei Leptospiren.



Nach Absättigung mit entsprechenden Stämmen:

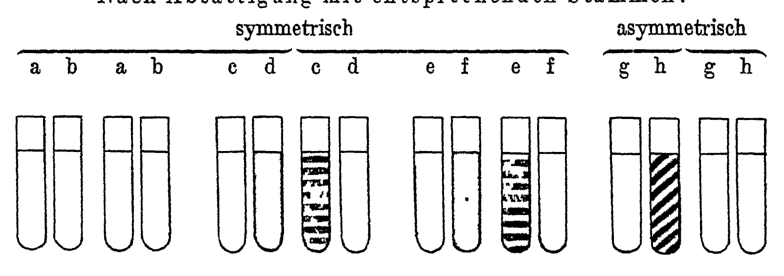


Abb. 4. Graphik[1]).

1) In den Rohrchen *e* und *f* ist die wechselseitige Mitagglutination durch den schwarzen Rand angedeutet, ohne damit über ihre eigentliche Natur etwas aussagen zu wollen. Nach der Absättigung treten diese aspezifischen Rezeptoren nicht mehr in Erscheinung. Das ist leicht zu verstehen. Wären sie von gleicher Wertigkeit wie die spezifischen Rezeptoren — was wir nicht wissen — so müßten aspezifische Rezeptoren, die eine Mitagglutination von, sagen wir, 100 hervorrufen, die vorhandene Masse von spezifischen Körpern von 3000 auf 2900 herabsetzen. Eine solche Verminderung aber, die sich theoretisch begründen läßt, entzieht sich unserer Beobachtung. Das gleiche würde geschehen, und zwar mit noch größerer Wahrscheinlichkeit, wenn die aspezifischen Rezeptoren qualitativ verschieden wären.

Bei homologen Antiseren ziehen die jeweilig gebrauchten Stämme die Antistoffe restlos heraus. Bei heterologen Paaren, auch wenn Mitagglutination auf einige Verwandtschaft weist, bleiben bei Absättigung mit dem heterologen Stamm die Antikörper für den eigenen Stamm unverändert in dem Serum zurück, und endlich bei nahverwandten Stämmen, wie die beiden Biotypen des klassischen „Weil", bindet die vollständige Type von beiden Antisera alle Antikörper, die Unvollständige nur die im eigenen Serum, ein asymmetrisches Resultat also.

Zusammenfassung.

Die Technik der Absättigung wird bis ins Einzelne beschrieben. Die routinemäßige Ausführung erfordert eine Zentrifuge von wenigstens 10000 ∞.

Zum Schluß wird eine schematische Vorstellung des Ausfalls der Reaktion beim Vergleichen von homologen, heterologen und nahe verwandten Leptospiren-Stämmen gegeben.

[Aus der Pockenabteilung des Institut Robert Koch
Abteilungsdirektor: Prof. H. A. Gins).]

Beiträge zur serologischen Differenzierung anaerober Leptotricheen.

Von Dr. med. Razi Maner aus Istanbul.

Die ersten Versuche, durch Immunisierung von Kaninchen mit Reinkulturen anaerober Leptothrix-Stämme spezifisch agglutinierende Seren zu gewinnen, sind im Institut Robert Koch von Beeck vor etwa zwei Jahren ausgeführt worden (Inaug.-Dissert. Berlin 1937). Er hat für seine Versuche drei Stämme verwendet, und zwar:

1. Leptothrix maxima (früher als Gi XXVII bezeichnet),
2. Leptothrix lanceolata (früher als Gi XXIII bezeichnet),
3. Leptothrix tenuis (früher als Gi XIX bezeichnet),
4. einen bisher noch nicht beschriebenen anaeroben Fadenbazillus.

Die Schwierigkeiten bei diesen Versuchen zeigten sich u. a. dadurch, daß der Stamm Leptothrix tenuis während der Immunisierung der Kaninchen das Wachstum einstellte, so daß keine brauchbaren Immunseren gewonnen werden konnten. Das mit dem bisher unbekannten Stamm gewonnene Serum konnte nicht verwertet werden, weil sich herausgestellt hatte, daß der zu seiner Herstellung verwendete Stamm in jeder Aufschwemmung starke Spontanagglutination zeigte. Es blieben so noch die Seren, die mit Leptothrix maxima und lanceolata hergestellt worden waren.

Die Auswertung ergab folgendes:

Das mit Lept. maxima hergestellte Serum agglutinierte den homologen Stamm stark bis zur Verdünnung 1/160, den anderen Leptothrix-Stamm

deutlich bis 1/40 und bei Ablesung nach 24 Std. schwach bis 1/80. Das mit Lept. lanceolata hergestellte Serum agglutinierte den homologen Stamm sehr stark bis 1/320. aber den anderen Leptothrix-Stamm nur bis 1/80 schwach und auch dies erst bei Ablesung nach 24 Std. Ein als Kontrolle herangezogener Stamm von Spirillum buccale Fortner blieb durch beide Immunseren völlig unbeeinflußt.

Daraus war also zu entnehmen, daß es

1. gelingt, mit Reinkulturen von anaeroben Leptothricheen agglutinierende Immunseren zu gewinnen, und daß
2. eine gewisse Spezifität der Reaktion zu erwarten ist.

Die Mitagglutination der Lept. lanceolata durch das Lept. maxima-Serum und umgekehrt wurde, ohne weitere Schlüsse daraus zu ziehen, zur Kenntnis genommen. Vielleicht ist es der Ausdruck einer näheren Verwandtschaft der beiden Arten, die auch im kulturellen und morphologischen Verhalten zum Ausdruck kommt. Es handelt sich um zwei morphologisch ähnliche Stämme, die durch die Größe deutlich unterschieden sind und von denen der eine, nämlich Lept. lanceolata, die sehr charakteristischen, unterbrochenen Fäden mit einem deutlich lanzettförmig zugespitztem Ende zeigt.

Die Versuche von Beeck waren dazu bestimmt und erwiesen sich als geeignet, die grundsätzliche Möglichkeit einer serologischen Differenzierung zu zeigen. Ueber die Auswirkungen einer solchen serologischen Prüfung konnten sie noch nichts aussagen. Die nunmehr weitergeführten Versuche sollten die früheren Ergebnisse nicht nur bestätigen, sondern möglichst auch erweitern.

Als Material standen folgende Stämme zur Verfugung:

1. Leptothrix fragmentata (fruher als Gi XV bezeichnet), aus Material einer angeblichen Aktinomykose (a),
2. Leptothrix fragmentata, aus einem Wurzelgranulom aus der Mundhohle von Prof. Gins isoliert (b),
3. Leptothrix tenuis (fruher als Gi XIX bezeichnet),
4. Leptothrix lanceolata (fruher als Gi XXIII bezeichnet),
5. ein aus meiner Mundhöhle isolierter Stamm, der noch nicht ausreichend identifiziert ist, vorläufig als Stamm „Maner" bezeichnet.

Die Stämme 1 bis 4 sind bereits vor einigen Jahren von Gins (Zbl. Bakter. I Orig., Bd. 132, S. 129. 1934) näher beschrieben worden. Es handelt sich dabei um Leptothricheen mit streng anaerobem Wachstum und charakteristischen morphologischen und biologischen Eigenschaften. Der Stamm 5 „Maner" wurde auf Grund des Aussehens auf der Fortner-Platte und der ersten Klatschpräparate von dieser als ein weiterer Stamm der Art Lept. fragmentata angesehen. Die mehrmalige Prüfung auf Wachstum unter aeroben Bedingungen hatte zuerst ein negatives Ergebnis. Nach mehreren Uebertragungen auf Fortner-Platte wurde das aerobe Wachstum noch einmal geprüft und dabei ergab sich nach mehrtägiger Bebrütung die Entwicklung einiger Kolonien, die sich morphologisch genau so verhielten wie diejenigen in der anaeroben Kultur. Der Vergleich dieses Stammes mit einer typischen Kultur der Leptothrix fragmentata zeigte dann aber doch so große Unterschiede, daß die beiden Stämme nicht als identisch angesehen werden können.

Die Immunisierung der Kaninchen wurde derart vorgenommen, daß zuerst eine intravenöse Injektion mit einer Kulturabschwemmung in Kochsalzlösung vorgenommen wurde, die eine halbe Stunde auf 50° erhitzt war. Im Abstand von 6—7 Tagen wurden dann weitere intravenöse Injektionen mit lebender Kulturabschwemmung gegeben. Die Menge der eingespritzten Bakterien wurde jedesmal etwas vergrößert, so daß zuletzt eine halbe Fortnerplattenkultur in 2 ccm zur Verwendung kam.

Das Serum des Kaninchens, welches mit dem Stamm 1 (Lept. fragmentata a) vorbehandelt war, wurde nach der 5. Injektion zu einer Probeagglutination benutzt. Sie hatte folgendes Ergebnis:

Stamm	Serumverdünnung					Kontrolle
	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	
Bac. fusiformis . . .	+ ?	+ ?	+ ?	+ ?	+ ?	nicht völlig homogen
Stamm „Maner“ . . .	+	+	+	+ ?	—	
Lept. fragmentata (a)	+	+	+	+	+ ?	
Lept. fragmentata (b)	+	+	+	—	—	

Dieser Agglutinationsversuch ergab kein eindeutiges Bild. Da die Aufschwemmung der Kultur in Kochsalzlösung nicht völlig homogen war, wurde sie weiterhin in 1proz. Formaldehydlösung angesetzt. Der Versuch wurde eine Woche später wiederholt, nachdem noch eine weitere intravenöse Injektion gegeben worden war.

Bei dem zweiten Agglutinationsversuch wurde auf die Einbeziehung eines Stammes von Bac. fusiformis verzichtet, da er infolge seiner Spontanagglutination sich als ungeeignet erwiesen hatte.

Der Versuch verlief dann folgendermaßen:

Stamm	Serumverdünnung					Kontrolle
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	
Lept. tenuis	++	++	++	+	+	—
Lept. lanceolata . . .	+	+	+ ?	+ ?	+ ?	—
Stamm „Maner“ . . .	+	+	+	—	—	—
Lept. fragmentata (b)	+++	+++	++	++	++	—
Lept. fragmentata (a)	+++	+++	+	+	+	—

Hier ergab sich also eine deutliche Beeinflussung des homologen Stammes, einer mit dem homologen Stamm gleichartigen Leptothrix anderer Herkunft und deutliche Agglutination einer anderen gut charakterisierten Leptothrixart, nämlich der Lept. tenuis. Außerdem wurde die Leptothrix lanceolata deutlich beeinflußt, wenn auch nicht so stark wie die anderen Stämme. Der Stamm „Maner“ aber, welcher sich durch sein aerobes Wachstum unterschied, zeigte die geringste Beeinflussung.

Die Prüfung des Serums eines weiteren Kaninchens, welches mit Lept. lanceolata in derselben Weise immunisiert war, verlief ganz ähnlich. Der Versuch wurde eine Woche nach Verabreichung der fünften intravenösen Injektion angesetzt.

Stamm	Serumverdünnung					Kontrolle
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	
Lept. fragmentata (b)	+ (++)	+ (++)	+ ? (+)	— (+ ?)	— (+ ?)	— —
Lept. fragmentata (b)	++ (++)	++ (++)	++ (++)	+ (+)	+ (+)	— —
Stamm „Maner“ . . .	+ (+)	+ (+)	+ (+)	+ (+)	+ (+)	— —
Lept. lanceolata . . .	+ (++)	+ (++)	+ (++)	+ (+)	+ (+)	— —
Spir. buccale Kochii .	+ ? (+)	+ ? (+)	+ ? (+)	— (—)	— (—)	— —

Die in Klammer gesetzten Zeichen bedeuten das Ergebnis der Ablesung nach 24 Std.

An diesem Versuch ist bemerkenswert, daß drei verschiedene Stämme, von denen zwei als sichere Leptothrix und der dritte als wahrscheinliche Leptothrix zu bezeichnen sind, von demselben Serum ungefähr gleich beeinflußt werden. Das hat sich, wenn auch weniger ausgeprägt, auch schon an dem Serum des mit Lept. fragmentata vorbehandelten Kaninchens gezeigt und spricht für eine gewisse Rezeptorenverwandtschaft der Gattung Leptothrix. Die Mitbeeinflussung der Spirillenkultur ergab Veranlassung zu weiteren Kontrollversuchen. Das normale Kaninchenserum erwies sich dieser Spirille gegenüber als völlig indifferent.

Die Agglutinationsfähigkeit dieses Serums wurde nach der sechsten Injektion noch einmal geprüft und zeigte dabei nahezu dasselbe Ergebnis. Ein Unterschied trat nur insofern auf, als die Leptothrix fragmentata und der Stamm „Maner" schon nach 2 Std. bis 1/320 agglutiniert waren und die Beeinflussung des homologen Stammes bereits bei der Verdünnung 1/160 ihr Ende erreicht hatte.

Außer diesen Versuchen mit Immunseren, die durch mehrmalige Vorbehandlung mit Reinkulturen gewonnen waren, wurden noch einige Menschenseren gepruft. Es stand zur Verfügung: Serum von Prof. Gins, aus dessen Mundhöhle ein Stamm von Leptothrix fragmentata gezüchtet worden war, Serum eines Pat. H., aus dessen Mundhöhle ein anderer Stamm von Lept. fragmentata gewonnen war und mein eigenes Serum, das ebenfalls mit dem homologen Stamm, dem Stamm „Maner", angesetzt wurde. Das Ergebnis dieses Versuches war folgendes:

1. Serum Prof. G. agglutinierte Lept. fragmentata (b) bis 1/40,
2. Serum Pat. H. agglutinierte Lept. fragmentata (a) bis 1/40,
3. Serum Maner agglutinierte den Stamm „Maner" bis 1/40.

Um nun zu sehen, ob das Menschenserum die Fähigkeit habe, die Anaeroben aus der menschlichen Mundhöhle unabhängig von ihrer Artzugehörigkeit zu beeinflussen, wurde das Serum eines beliebigen Patienten, der nicht wegen einer Erkrankung innerhalb der Mundhöhle in Behandlung war, mit einigen unserer Stämme geprüft. Die Ablesung der Agglutination nach 2 Std. war gegenüber allen Stämmen negativ. Nach 24 Std. war Agglutination in der Serumverdünnung 1/20 positiv gegenüber Lept. fragmentata (a und b), in der Verdünnung 1/40 positiv gegenüber dem Stamm „Maner" und negativ gegenüber der Lept. lanceolata. Wenn hierbei auch keine diagnostisch verwertbaren Agglutinationstiter gefunden wurden, so haben sich doch Andeutungen für eine Beeinflussung der Stämme durch das Patientenserum ergeben, die denen entsprechen, die weiter oben mitgeteilt waren. Sie geben immerhin Hinweise in der Richtung eines weiteren Ausbaues solcher Untersuchungen.

Schließlich wurde die Beobachtung, daß der Stamm Spirillum buccale Kochii (Gins, Med. Welt, 1939, im Druck) von dem einen Kaninchen-Immunserum bis 1/80 agglutiniert worden war, einer Nachprüfung unterzogen. Es wurde dieser Stamm deshalb noch einmal mit einem Normal-Kaninchenserum und mit den beiden vorhandenen Immunseren geprüft. Die Ablesung wurde nach 2 und nach 24 Std. vorgenommen und jedesmal die Verdünnungsreihe bis 1/320 angesetzt. Dieser Versuch verlief völlig negativ, und es mußte daher angenommen werden, daß bei dem ersten Ergebnis ein nicht mehr aufklärbarer Fehler unterlaufen war.

Zusammenfassung.

1) Durch Vorbehandlung von Kaninchen mit intravenösen Einspritzungen von Reinkulturen anaerober Leptothrix-Stämme wurden Seren gewonnen, die nicht nur den homologen Stamm, sondern auch andere Stämme von Leptothrix oder leptothrix-ähnlichen Bakterien agglutinierten.

2) Ein als Kontrolle dienender Spirillenstamm blieb unbeeinflußt.

3) Im menschlichen Serum konnten in einigen Fällen Agglutinine für anaerobe Leptothrix in geringer Menge nachgewiesen werden.

4) Der weitere Ausbau dieser Versuche ist zu empfehlen, da er zu weiteren diagnostischen Hilfsmitteln bezüglich der Identifizierung der Leptothrix-Stämme führen und zur Feststellung ihrer pathogenen Fähigkeiten im menschlichen Körper beitragen könnte.

[Aus der Staatlichen Anstalt für bakteriologische Untersuchungen in Graz (Direktor: Prof. Hammerschmidt).]

Ueber die Wirkungsweise des Prontosils.

Von Johann Hammerschmidt.

Mit 1 farbigen Tafel.

Der großen Bedeutung, die der Einführung der Sulfonamidverbindungen, insbesondere des Prontosils, in die Therapie zukommt, entspricht auch die intensive Bearbeitung der Frage nach der Art ihrer Wirksamkeit. In Veröffentlichungen aus der letzten Zeit faßt Domagk (1, 2) seine Auffassung auf Grund eigener und fremder Untersuchungen dahin zusammen, daß „die Substanzen im Organismus an den Kokken angreifen, daß sie aber die Bakterien in vielen Fällen gar nicht selbst abtöten, sondern nur so weit schädigen, daß sie für den Organismus angreifbar werden, und zwar besonders durch die Phagozytose von Leukozyten und anderen Entzündungszellen“; an anderer Stelle (3): „. . . außerdem zeigte sich, daß der Angriffspunkt von chemotherapeutisch wirksamen Substanzen ein anderer ist als der des Serums; die chemotherapeutisch wirksamen Substanzen greifen am Erreger selbst an, töten ihn ab oder hindern ihn direkt am Wachstum durch Veränderung seiner Struktur, nicht nur durch Abbindung seiner Gifte.“

Es kommt somit nach dieser Auffassung der direkten Einwirkung des Chemotherapeutikums — es sei im folgenden nur das Prontosil in Betracht gezogen — auf den Mikroorganismus selbst eine Hauptrolle zu. So erwähnt Domagk (4) degenerative Veränderungen an den Kokken, die für dieses direkte Angreifen des Prontosils an den Streptokokken sprechen würden. Levaditi und Vaisman (5) sahen, daß bei Kontrolltieren die Streptokokken eine Kapsel besitzen, die sie anscheinend gegen die Angriffskräfte des Organismus schützt,

wogegen bei Prontosilbehandlung die Bildung der Kapsel unterbleiben soll, ein Befund, den Domagk (6) bestätigen konnte, da nach seinen Angaben an den ins Blut eingedrungenen Streptokokken mittels Giemsafärbung eine Kapsel nachzuweisen sei. Andererseits muß es aber doch auffallen, daß alle Versuche, dieses direkte Angreifen am Erreger in vitro zu demonstrieren, so wenig überzeugende Ergebnisse hatte. Vor allem war die Wirksamkeit des Prontosils verschiedenen Stämmen gegenüber ganz verschieden, ja eigentlich fast nur in Ausnahmefällen nachzuweisen, während in vivo das Prontosil gegen alle Streptokokkenstämme wirksam ist; manchmal sind sogar bei einschlägigen Versuchen die Streptokokken in mit Prontosil versetzten Nährböden besser gewachsen als in solchen ohne Prontosil. Eine Wirksamkeit des Prontosils in vitro war nur bei Anwesenheit von Blut nachzuweisen, doch war andererseits das Blut von mit großen Prontosilgaben behandelten Kaninchen ohne Wirkung. Es ist schwer, anzunehmen, daß diese Art Abwehr in den mit Streptokokken überschwemmten Geweben eine nennenswerte Bedeutung haben sollte. Uebrigens wäre eine spezifische Wirkung auf die Streptokokken, die von Domagk betont wird, auch ganz gut ohne direkte Beeinflussung der Bakterien möglich und verständlich.

Trotz dieses primären Angreifens des Prontosils an den Kokken wird dem Organismus immer noch eine entscheidende Rolle bei der endgültigen Vernichtung der Keime zugeschrieben. Dazu wird angenommen, daß die Streptokokken durch das Prontosil gewissermaßen in dem Sinne präpariert werden, daß sie den Angriffskräften des Makroorganismus, vor allem der Phagozytose durch die Leukozyten, verfallen. Diese Annahmen stützen sich auf Befunde, die bei intraperitonealer Infektion der Maus erhoben wurden. Hier finden sich bei den mit Prontosil behandelten Tieren nach 24 Std. im Peritonealexsudat große endotheliale Zellen mit mehr Vakuolen als sonst, sowie einzelne Leukozyten, dagegen bei entsprechender Dosierung des Prontosils keine Streptokokken mehr, während im Kontrolltier ungemein reichliche Streptokokken und nur spärlich geschädigte Leukozyten zu sehen sind. Aber die Injektion größerer Streptokokkenmengen, also eines Wundinfektionserregers, in die Bauchhöhle muß zu abnormen Abwehrreaktionen des Organismus führen, die sich sicher mit der natürlichen Abwehr gegen diesen Infektionserreger nicht decken. Die daraus gezogenen Schlüsse sind mit größter Vorsicht zu verallgemeinern. Dazu kommt, daß die Unschädlichmachung durch Phagozytose in den meisten Fällen nur wegen des Verschwindens der Bakterien angenommen wird.

Leider ist die Maus als Versuchstier für die Darstellung der Streptokokkenabwehr durch Prontosil nur bedingt geeignet. Zunächst ist die Resistenz der Tiere gegen verschiedene menschenpathogene Streptokokkenstämme durchaus verschieden; verschieden ist ferner auch die Resistenz gegen subkutane oder intraperitoneale Infektion. Endlich erreicht die Behandlung mit Prontosil ihr Ziel nicht durch ein- oder zweimalige Einverleibung des Präparates, sondern es muß periodisch immer wieder neuerdings verabreicht werden, um die Tiere dauernd zu schützen. Bleibt die Behandlung auch nur einen Tag aus — falls die Krankheit sich über mehrere Tage hinzieht —, ist meist der ganze Erfolg in Frage gestellt. Ich hoffe, in folgendem den Grund hierfür zeigen zu können. Dasselbe gilt scheinbar auch vom Menschen; so schildert Frankl (7) den Fall eines Erysipelkranken, bei dem sich mit Prontosilbehandlung die Symptome in 24 Std. rasch besserten; aber als für einige Stunden Prontosil abgesetzt wurde, flammte das Erysipel sofort wieder auf, um nach neuerlicher Behandlung zu verschwinden. Domagk empfiehlt daher, die Mäuse zunächst 1 Std. nach der Infektion mit Prontosil zu behandeln, die Behandlung nach 8—9 Std.

und darauf alle 24 Std. zu wiederholen. Nach meinen Erfahrungen mit subkutanen Injektionen von Prontosil solubile, die ich aus Zweckmäßigkeitsgründen zu den Heilungsversuchen der Maus verwendete, war die einmalig tägliche Behandlung unzureichend, ich habe daher 2mal täglich 0,4—0,5 ccm Prontosil injiziert. Aber auch bei dieser sicher sehr eingreifenden Behandlung ist mir immer nur ein Teil der Versuchstiere erhalten geblieben. Auch nach Levaditi werden im besten Falle bis zu 75 Proz. der behandelten Tiere geheilt, niemals 100 Proz.

Diese Inkonstanz bei einem in der Therapie des Menschen so vorzüglich wirkenden Chemotherapeutikum veranlaßte mich, den Wirkungsmechanismus des Prontosils auf einem anderen Weg zu untersuchen, der dem Infektionsmodus des zugehörigen Erregers angepaßter ist, nämlich mit subkutaner Infektion. Ich verwendete dazu eine Methode, die mir bei der Untersuchung der Wirkung antiinfektiösen Serums (Schweinerotlauf) (8), ferner der Wirkung des Diphtherieanatoxins und Diphtherieheilserums (9) gute Dienste geleistet hatte: die Einbringung geringer Bakterienmengen in einem diffusiblen Medium, nämlich Agar. Gerade die Erfahrungen beim Schweinerotlaufserum regten zu diesen Untersuchungen an, da mir wiederholt von praktischen Aerzten berichtet wurde, daß auch das Erysipel bei Prontosilbehandlung oft wie abgeschnitten stehen bleibt, ohne weiterzugreifen. Auch nach Levaditi hat es den Anschein, als ob das Prontosil das Eindringen der Kokken in den Organismus verhindert, ein Befund, der sehr an die Verhältnisse bei der Behandlung mit Schweinerotlaufserum erinnert.

Die Untersuchungen wurden mit Streptokokkenstämmen durchgeführt, die sich bei subkutaner Injektion für die Maus als virulent erwiesen hatten, wobei sich aber der Verlauf der Krankheit durch einige Tage hinzog. Zu je 2 ccm 3proz. Nähragars, der in Röhrchen abgefüllt und sterilisiert war, wurde nach dessen Verflüssigung und Abkühlung auf 56° etwa 0,5 ccm der 100—500-fachen Verdünnung einer 24stünd. Bouillonkultur des Streptokokkenstammes zugesetzt und davon etwa 1 ccm mit einer stärkeren Nadel subkutan dem Tier an einer Flanke injiziert. Der Agar erstarrt in wenigen Minuten unter der Haut zu einem tastbaren Knollen. Zur Behandlung wurden, wie bereits erwähnt, kurze Zeit nach der Infektion, ferner nach etwa 7 Std. und darauf 2mal täglich je 0,4—0,5 ccm Prontosil solubile subkutan eingespritzt. Die Kontrollen blieben ohne Prontosilbehandlung. In dieser „Körper-Agar-Kultur“ entwickeln sich die eingebrachten Kokken wie in künstlichen Agarkulturen zu Kolonien, die allmählich, ähnlich einer natürlichen Infektion, mit dem Körper in Beziehung treten. Dabei diffundieren vom Körper her gelöste Substanzen in den Agar und bringen die Bakterien unter ihren Einfluß. Tatsächlich sieht man bei der Autopsie kurz vorher behandelter Mäuse, daß der ganze Agarknollen diffus die rote Prontosilfarbe aufweist. Zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion wurden Versuchs- und Kontrollmäuse durch Chloroform getötet, die Agarknollen mit den umgebenden Geweben herauspräpariert, in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Zur histologischen Untersuchung wurden die Schnitte nach Gram mit Lithionkarminvorfärbung behandelt, wobei sich die tiefdunkelblau gefärbten Bakterien sehr kontrastreich vom roten Grund abheben. Die bei der histologischen Untersuchung der zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion getöteten Mäuse aus zahlreichen Versuchsserien erhobenen Befunde sollen der Kürze wegen summarisch geschildert werden. Tatsächlich spielte sich der ganze Prozeß immer in der gleichen jetzt zu besprechenden Folge ab, wobei nur die größere oder geringere Virulenz das Tempo bestimmt.

Die infizierte, aber nicht behandelte Maus zeigt ebenso wie die mit Prontosil behandelte in den ersten Stunden (etwa 7 Std. nach der Infektion)

um den Agarknollen herum eine homogene Schicht geronnenen Exsudates, in welches allmählich Leukozyten einwandern und das auch schon Streptokokkenkolonien einschließt. Darunter liegt ein von einem Fibrinnetz mit eingestreuten Leukozyten erfüllter Raum, worauf das Körpergewebe folgt. Im Agar sieht man Streptokokkenkolonien, die sich aus den mit dem Agar eingebrachten Kokken entwickelt haben. Wenn die Infektion nicht zu rasch verläuft, so nimmt die Leukozyteneinwanderung immer mehr zu, so daß sich nach etwa 20 Std. um den Agarknollen ein deutlicher Leukozytenwall gelegt hat, allerdings ist er nicht so scharf ausgerichtet und undurchdringbar wie bei den mit Prontosil behandelten Tieren. Die Streptokokkenkolonien haben sich inzwischen mächtig vergrößert, besonders im körpernahen Teil des Agars, während im Zentrum des Agarknollens nur wenige und kleine Kolonien zu sehen sind, eine Erscheinung, die ich ebenso bei Schweinerotlauf als bei Diphtherie in dafür empfänglichen Tieren beobachten konnte, während bei unempfänglichen Tieren die Kolonien die Körpernähe meiden, dafür aber im Agarzentrum reichlicher und größer sind. Dieses Verhalten ist anscheinend auf eine vom Körper bei empfänglichen Tieren abgesonderte Substanz zurückzuführen, welche in entsprechender Konzentration das Wachstum der Bakterien fördert. Gleichzeitig ist festzustellen, daß nach 20 Std. die Streptokokken beim nichtbehandelten Tier bereits in Massen das Exsudat und den Wall durchbrochen haben und auf breiter Basis in die Tiefe wandernd alle Spalten im Gewebe und die Interzellularräume dicht erfüllen. Namentlich die Muskelbündel sind von Massen schwarzblau gefärbter Kokken geradezu umspült (Abb. 1).

Dieses Einwandern in die Tiefe erfolgt rasch oder langsam je nach der Virulenz des Stammes. Dauert der Krankheitsprozeß längere Zeit, so kann man manchmal feststellen, daß in der Tiefe im Gewebe (Abb. 1 w.) sich wieder Leukozyten sammeln, den eindringenden Bakterien entgegenstellen und wieder einen Wall zu bilden versuchen, aber sie werden überrannt und stellen für die fortstürmenden Streptokokken kein Hindernis dar. So ist von einer Abwehr beim nichtbehandelten Tier nichts zu sehen; weder Phagozytose noch Bakterizidie noch ein anderer Hemmungsmechanismus tritt in Aktion. Bei der ungeheuren Masse der sich vom Agar in den Körper ergießenden Kokken ist von solcher Abwehr auch keine Hilfe zu erwarten. Wo zunächst Streptokokken die angelagerten Leukozytenwälle durchdringen, gehen die Leukozyten reichlich zugrunde, es bleiben nur pyknotische Kerntrümmer übrig; manchmal macht es den Eindruck, daß die Kerne wie bei einer Explosion in Teilstücke zerrissen werden. Bereits nach 20 Std. finden sich beim nichtbehandelten Tier in den Organen, vor allem aber auf dem Peritonealüberzuge von Leber, Milz und Niere, Streptokokken.

Während sich in der Körper-Agar-Kultur in den ersten Stunden annähernd gleiche Verhältnisse bei unbehandeltem Kontroll- und Versuchstier zeigen, ist nach 20 Std. bei letzterem, da hier das Tempo des Zustromes der Leukozyten sehr beschleunigt ist, schon ein dichter Leukozytenwall um den Agar gebildet. Im Agar selbst haben sich die Streptokokken reichlich vermehrt, besonders in dem körpernahen Teil, und liegen hier als schwarzblau gefärbte Massen dem Wall an. Zwischen Wall und Körpergewebe findet sich dann ein lockeres Netzwerk aus Fäden geronnenen Exsudates mit eingestreuten Leukozyten. Die Breite dieser Schicht hängt von der Entfernung des Körpergewebes (Muskulatur) vom Wall ab. Bei stärkerer Vergrößerung zeigt sich der Wall im allgemeinen für die Bakterien als unübersteigbares Hindernis, so daß eine Invasion in den Körper fast ausgeschlossen ist. Dringen, was an Stellen mangelhaften Abschlusses der Fall sein kann, einige Bakterien doch durch den Wall, so werden sie sofort von neu herbeieilenden Leukozyten wie durch eine Wand

vom Körper abgeriegelt (Abb. 2). Der Wall schließt somit an der dem Körper anliegenden Fläche des Agars dicht ab; an den seitlichen Partien, am Umschlag zu der der Haut zugewendeten Fläche, grenzt wieder ein von Leukozyten durchsetztes Faserwerk den Agar ab. Hier dringen die Kokken auch etwas tiefer ein, aber auch hier eilen sofort Leukozyten herbei und schließen den drohenden Durchbruch ab. Nirgends aber zeigt sich eine Abwehr durch Phagozytose; weder beim Kontroll- noch beim Versuchstier ist von diesem Abwehrmittel etwas zu bemerken. Auch Veränderungen der Streptokokken sind nicht festzustellen, diese sind im Gegenteil alle wohlgeformt, gut färbbar, ohne Spur von Degeneration, und vermehren sich ungeheuer.

Allmählich gehen aber die den innersten Wall zusammensetzenden Leukozyten anscheinend durch die Wirkung des Streptokokkentoxins fast in toto zugrunde (Abb. 3), bilden eine Lamelle von pyknotischen Kerntrümmern, die auch reichlich von Kokken durchsetzt ist. Aber bereits sind aus der Tiefe des Körpergewebes massenhaft neue Leukozyten herbeigeeilt und haben einen neuen Abwehrwall errichtet. Immer wieder kann man feststellen, daß an Stellen, wo ein Einbruch aus irgendeinem Grunde erfolgt, sofort eine neue Leukozytenschranke die Kokken abriegelt und am weiteren Vordringen hemmt. Namentlich in Fällen, wo die Behandlung ungenügend in zu großen Zwischenräumen durchgeführt wurde, können die Kokken den Wall durchbrechen und den Körper bedrohen. Falls wieder rechtzeitig die Behandlung einsetzt, kann die Gefahr durch neue Leukozytenabriegelung gebannt werden. Aber auch bei solchen Einbrüchen kommt es nirgends zur Phagozytose, die bei den Massen von Bakterien auch nichts auszurichten vermöchte. Nach längerer Zeit (etwa von der 50. Std. nach Infektion mit Streptokokken geringerer Virulenz) sieht man allmählich in der dem Körpergewebe anliegenden Partie des lockeren Fasergewebes unter dem Wall, das jetzt eine breite Schicht darstellt, neben den Leukozyten auch spindelförmige Zellen auftreten, die sich allmählich zu einer dem Muskelgewebe aufliegenden schmalen Bindegewebslage zusammenschließen und so die äußere Wand des kommenden Abszesses bilden, durch die das Körpergewebe sicher geschützt wird. Inzwischen umgibt den Agar zunächst eine dicke Lage zerfallener Leukozyten, deren Kerntrümmer mit Massen von Kokken dicht gemengt sind, dann folgt das schon erwähnte lockere Granulationsgewebe und dann erst die den Abszeß abschließende Bindegewebsschicht. In dem lockeren Granulationsgewebe sowie in dem seitlich den Abszeß umschließenden lockeren Fasergewebe sieht man zuerst — aber auch erst zu so später Zeit — Schädigungen von Kokken, die in dieses Gewebe gelangt sind, wie angenagt aussehen, oft nur mehr Splitter zurücklassen. Derartige Bakterien und ihre Reste werden hier auch von Leukozyten aufgenommen. In diesem Stadium ist aber der Kampf zwischen Körper und Mikroorganismus bereits zugunsten des ersteren entschieden und die allmähliche Vernichtung der Keime im geschlossenen Abszeß nur eine Frage der Zeit.

Auf Grund der geschilderten Befunde ist somit festzustellen, daß unter dem Einflusse des Prontosils ein besonders starker Zustrom von Leukozyten erfolgt, der einen dichten Abschluß zwischen dem Körpergewebe und den Streptokokken im Agar herstellt. Nach dem ganzen Verlaufe dürfte es sich dabei kaum allein um die mechanische Seite eines Passagehindernisses handeln, sondern man bekommt den bestimmten Eindruck, daß dabei auch humorale Kräfte tätig sind, daß von den Leukozyten abgesonderte Stoffe in Wirksamkeit treten, welche das Eindringen der Bakterien in den Körper dadurch verhindern, daß sie die ebenfalls hypothetischen Angriffsstoffe der Leukozyten paralysieren. Diese Auffassung entspräche der Aggressin-Antiaggressin-Theorie Bails, nur wäre das Antiaggressin hier kein Ergebnis der Immunisierung,

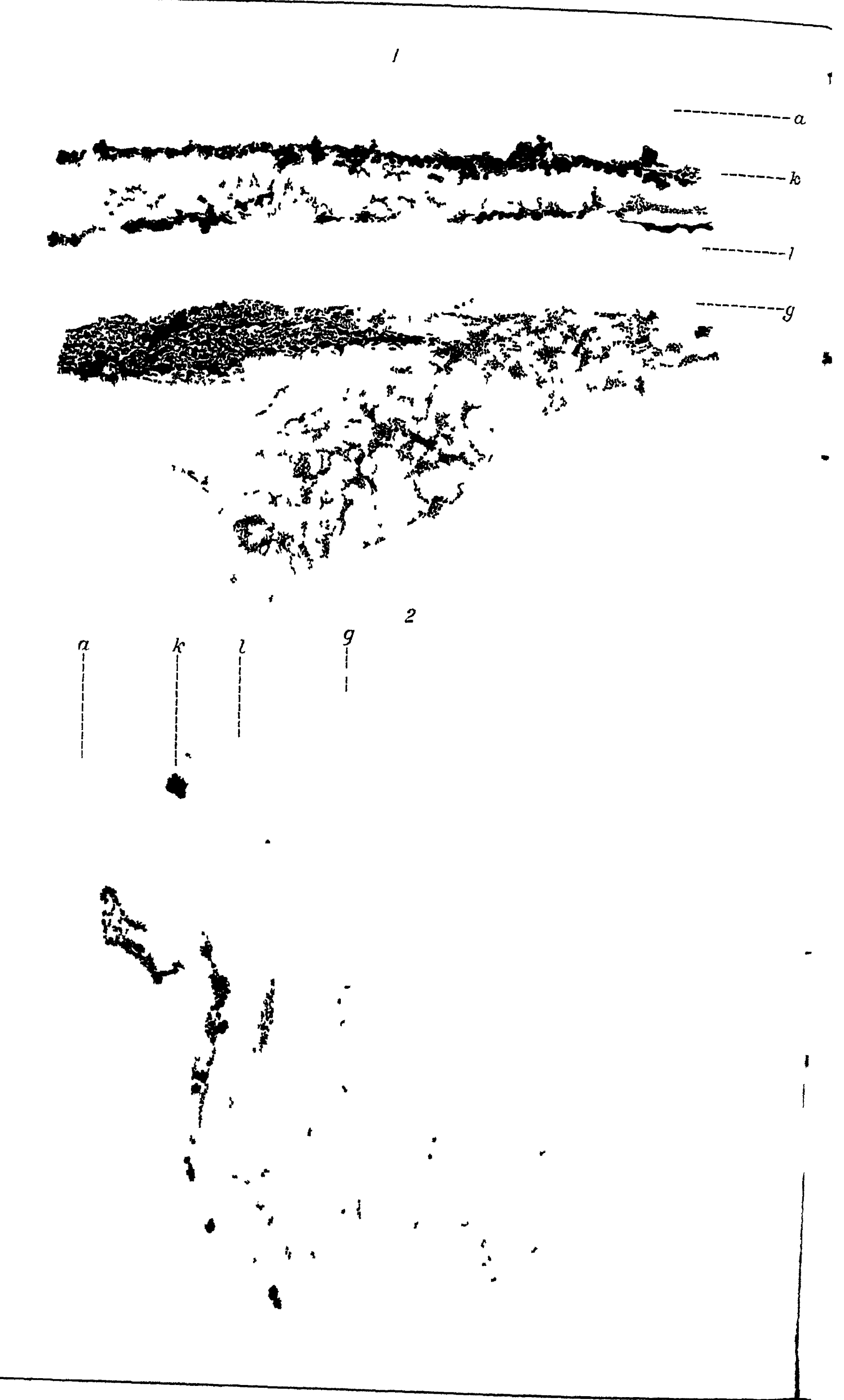
sondern würde von den Leukozyten unter dem Einflusse des Prontosils sofort abgegeben. Die Permeabilität der Gewebe erhöhende Faktoren von Aggresincharakter wurden auch von Seiser, Dombrowsky und Bieling (10) bei ihren grundlegenden Untersuchungen über lokale Infektionsabwehr (intrakutane Pneumokokkeninfektion) für Pneumokokken angenommen.

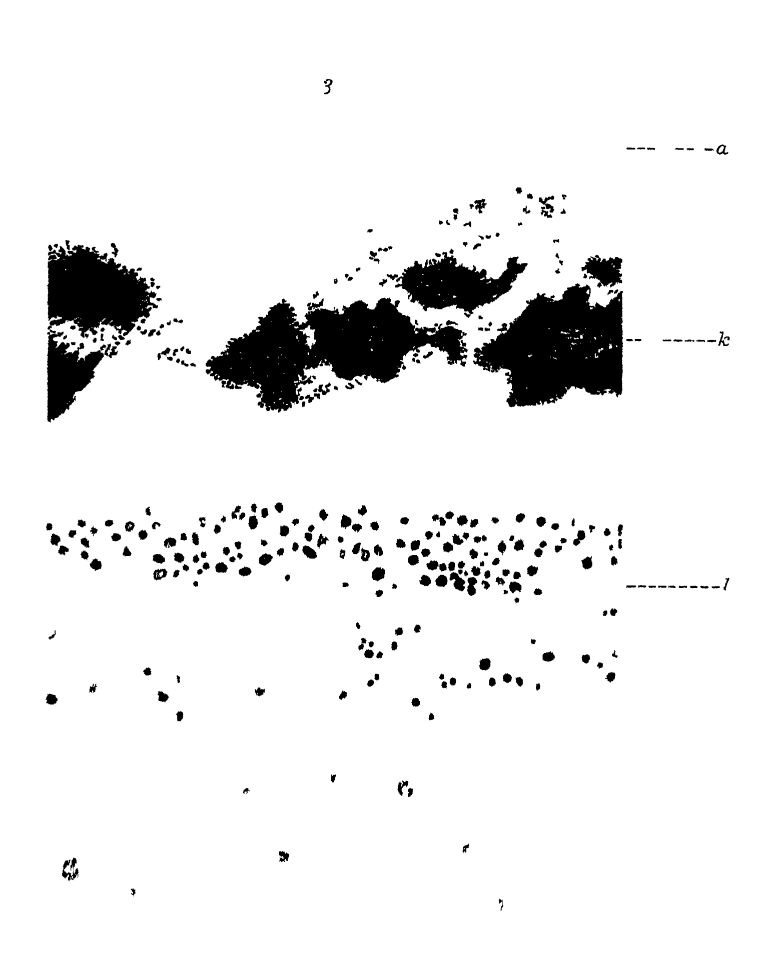
Wo der Leukozytenwall dennoch von den Kokken durchbrochen wird — am ehesten, wenn die Behandlung in zu großen Intervallen erfolgt —, sieht man beim behandelten Tier sofort neue Reihen von Leukozyten aus dem Körper herbeieilen und die Eindringlinge durch einen neuen Wall von dem weiteren Vordringen abhalten. Das gelingt auch meist, wenn die Prontosilbehandlung rechtzeitig wieder einsetzt; bei zu großen Behandlungsintervallen reicht aber die Abwehrkraft nicht mehr aus, dann dringen die Kokken ungehemmt in die Tiefe.

Sicher aber hat die Phagozytose keinen Anteil an der Abwehr. Daß die Phagozytose im nichtbehandelten Kontrolltier keine Rolle spielt, ist erklärlich, da es sich hier um schwer pathogene Keime handelt, vor deren Beseitigung sich die Leukozyten hüten; dadurch erhält ja der Erreger die Möglichkeit, sich reichlich zu vermehren und nach Durchbrechung der hier ungenügenden Leukozytenabwehr den Körper zu überschwemmen. Von der Einwirkung des Prontosils, das zwar nicht die Vermehrung der Keime, wohl aber ihr Eindringen in den Organismus verhindert, wäre eine reichliche Phagozytose als wichtigstes Abwehrmittel sicher zu erwarten und wird auch von allen Untersuchern der Prontosilwirkung als gegeben angenommen.

Die Leukozyten an der vordersten Front gehen sehr rasch auf der ganzen Linie durch die Toxine der Streptokokken zugrunde, bilden dann nur mehr Lagen pyknotischer Kerne, die als Lamellen abgestoßen und bereits von einer neuen Leukozytenlage ersetzt werden, bis sich um den werdenden Abszeß eine bindegewebige Hülle gebildet hat. Schon aus diesem Grund wäre eine einsetzende Phagozytose ergebnislos. Dieses Zugrundegehen der Leukozyten in Massen widerlegt aber die Behauptung Levaditis, daß die Prontosilpräparate die von den Streptokokken gebildeten Gifte binden.

Gegenüber den Verhältnissen beim behandelten Tier ist beim nichtbehandelten ein hemmungsloses Eindringen der Streptokokken in den Organismus festzustellen, wovon sie durch keinen Abwehrmechanismus abgehalten werden; auch hier ist weder Phagozytose noch Bakterizidie festzustellen, die diesen Massen gegenüber ohnehin machtlos wären. Von großem Interesse war es, die Richtigkeit der Angaben von Levaditi und Vaisman hinsichtlich der Kapselbildung im Kontrolltier zu überprüfen. Es sollen sich nämlich die Streptokokken im unbehandelten Tier mit Kapseln umgeben, die sie gegen die Abwehrkräfte des Körpers schützt, während unter Prontosilwirkung die Kapselbildung unterbleibt. Ich habe zu diesem Zwecke alle gebräuchlichen Kapselfärbungen, ferner die verlängerte Giemsafärbung und die Tuschebehandlung mit Nachfärbung verwendet, aber ich konnte in keinem Falle im Blute oder in den Organen der Kontrolltiere Kapselbildung feststellen; zwischen Streptokokken aus Kontroll- und Versuchstier bestanden in dieser Richtung keinerlei Verschiedenheiten. Es wäre auch im Falle der Bestätigung der Angaben Levaditis eine logische Folgerung, daß die nichtbekapselten Kokken der Prontosiltiere in Analogie zu den unbekapselten Milzbrandbazillen dann eben der Phagozytose anheimfallen müßten, was aber nicht der Fall ist. Levaditi hat weiter darauf aufmerksam gemacht, daß solche „animalisierte“ Streptokokken mit Kapseln bei Uebertragung auf neue Mäuse durch Prontosil nicht mehr zu beeinflussen wären. Ich kann auch diese Angabe nicht bestätigen, da ich Mäuse, die mit Streptokokken direkt aus der 3. Mäusepassage infiziert waren, mit


1
a
k
l
g
2
a
k
l
g



Lith Anst v E A Funke Leipzig

Prontosil dauernd heilen konnte, während die Kontrollen eingingen. Endlich ist auch von degenerativen Veränderungen an den Streptokokken nichts zu bemerken, sondern diese vermehren sich ungeheuer, solange der Kampf zwischen Körper und Erreger im Gange ist. Erst wenn der Krankheitsherd als Abszeß von der Umgebung abgeschlossen wird, kann ein allmähliches Absterben der Kokken in geringem Ausmaß festgestellt werden.

Zusammenfassung.

Die mit Streptokokken in Körper-Agar-Kultur infizierten Mäuse zeigen unter Prontosilbehandlung einen starken Zustrom von Leukozyten, die, ohne zu phagozytieren, als unpassierbarer Wall das Eindringen der Bakterien in den Körper verhindern. Falls aus irgendeinem Grunde (wie mangelhafte Behandlung) der Wall nicht standhält, riegeln sofort neu zuwandernde Leukozyten den Einbruch ohne Phagozytose wieder ab. Dabei gehen die obersten Lagen von Leukozyten immer wieder toxisch zugrunde. Eine direkte Beeinflussung der sich im Agar mächtig vermehrenden Streptokokken ist nicht festzustellen, keinerlei Kapselbildung, Bakterizidie oder Phagozytose. Für die Hemmung der Einwanderung der Kokken in den Körper ist nicht nur das mechanische Hindernis, sondern wahrscheinlich auch eine humorale Abwehr entsprechend den Antiaggressinen in Betracht zu ziehen. Demgegenüber dringen beim nicht mit Prontosil behandelten Tier die Bakterien hemmungslos in die Tiefe und überschwemmen den Körper.

Schrifttum.

1) Domagk, „Prontosil", Sammelbericht der Firma Bayer, Leverkusen. — 2) Ders., Klin. Wschr. **1937**, 1415. — 3) Ders., Derm. Wschr. **107**, 1938. — 4) Ders., „Prontosil". — 5) Levaditi und Vaisman, Presse médicale **1935**, 2097. — 6) Domagk, Z. klin. Med. **132** (1937). — 7) Frankl, Klin. Wschr. **1938**, 775. — 8) Hammerschmidt, Zbl. Bakter. I Orig. **142**, 168 (1938). — 9) Ders., ebenda **143**, 345 (1939). — 10) Seiser, Dombrowsky und Bieling, Arch. Hyg. **120** (1938).

Tafelerklärung.

Abb. 1. Agar mit Streptokokken subkutan in nicht vorbehandelter Maus, ca. 56 Std. nach der Injektion. Grampräparat. Die Bakterien haben, aus den Kolonien im Agar einwandernd, alle Gewebe überschwemmt.

Abb. 2. Agar mit Streptokokken subkutan in regelmäßig mit Prontosil solubile behandelter Maus. Grampräparat. Ein Leukozytenwall hat die Streptokokken vom Körper abgeriegelt. Wo doch ein Einbruch der Bakterien erfolgt (Mitte des Bildes), legen sich sofort neue Leukozyten vor das Körpergewebe. Keine Phagozytose.

Abb. 3. Agar mit Streptokokken subkutan in mit Prontosil behandelter Maus, ca. 20 Std. nach Injektion. Grampräparat, stärkere Vergrößerung. Der Leukozytenwall, der an die Kokkenmassen angrenzt, geht allmählich ohne Phagozytose zugrunde.

Zeichenerklärung: l = Leukozytenwall, a = Agar, k = Kolonien von Streptokokken, g = Gewebe des Versuchstieres.

[Aus der Serumabteilung des „Laboratorio Paulista de Biologia“
São Paulo (Brasilien) (Leiter: Dr. A. Zink).]

Beitrag zur Frage der Sterilhaltung von Heilseren.

I. Untersuchung über den Wert der gebräuchlichsten Konservierungsmittel.

Von A. Zink.

So vorzüglich auf einzelnen Gebieten, wie z. B. in der Nahrungsmittelhygiene oder auch in der pharmazeutischen und kosmetischen Industrie unsere Konservierungstechnik ist, so unbefriedigend ist sie in der Konservierung und Sterilhaltung biologischer Produkte. Unter ihnen wiederum nehmen die tierischen Heilseren und die Rekonvaleszentenseren wegen ihrer großen Labilität eine besondere Stellung ein. Die Unzulänglichkeit aller bisher verwandten Konservierungsmittel zeigt sich vor allem in den wärmeren Ländern. Einmal ist der Keimgehalt der Luft und damit auch die Kontaminationsgefahr viel größer. Ferner aber üben der wechselnde, oft sehr hohe Feuchtigkeitsgehalt der Luft, die schnellen und nicht selten beträchtlichen Temperaturstürze einen deutlich wahrnehmbaren Einfluß auf das Serum, seine Klarheit und Sedimentbildung aus. — Wir benutzen zur Serumgewinnung das Koagulationsverfahren. Dabei haben wir es uns im hiesigen Klima zur Regel gemacht, an kühlen und niederschlagsreichen Tagen die Entblutung zu verschieben oder aber Zitratplasma zu ernten. Denn an solchen Tagen wird der Blutkuchen auch bei hoher Belastung durch Gewichte schlecht ausgepreßt. Abgesehen davon, daß infolgedessen die Ausbeute gering ist, ist auch das erhaltene Serum meist trüb. Ferner macht sich das zugefügte Konservierungsmittel durch vermehrte Depotbildung in viel höherem Maße störend bemerkbar. — Alle die genannten Schwierigkeiten haben dazu geführt, daß einzelne große Institute (Pasteur-Institut) mehr und mehr dazu übergehen, im wärmeren Klima Trockenserum zu verwenden, das der Arzt vor der Injektion selbst in destilliertem Wasser wieder auflösen muß. Da unser Bestreben immer darauf gerichtet ist, mit allen Seren ein Minimum an Manipulationen vorzunehmen und dem Arzt das Produkt fix und fertig zur Injektion zu liefern, scheint uns das Trockenserum kein idealer Ausweg.

Wir haben lange Zeit, dem deutschen Brauch folgend, genau wie den Vakzinen, unseren Seren Acidum phenicum zugesetzt, und zwar in der Relation von 0,6 Proz. In diesem Verhältnis macht sich im hiesigen Klima der Phenolgeruch bereits störend bemerkbar. Trotzdem aber sahen wir bei längerer Lagerung gelegentlich Infektionen der durch Phenol geschützten Seren. Da es ferner hier üblich ist, in einzelnen Fällen, z. B. bei dekláriertem Tetanus, enorme Mengen von Serum zu spritzen, kommt es nicht so selten vor, daß

ein Patient auf diese Weise gleichzeitig 1 g und selbst mehr Phenol appliziert bekommt, d. h. also mindestens 5 tödliche Meerschweinchendosen. Es ist klar, daß eine solche Giftmenge nicht ohne Einfluß auf den ohnehin kranken Organismus ist.

In dem Bestreben, diese Mängel zu beheben und unsere Seren zu verbessern, haben wir eine Reihe von Konservierungsmitteln auf ihre Eignung zur Serumkonservierung untersucht. Es fanden dabei zunächst nur die schon verschiedenerorts im Gebrauch befindlichen Substanzen zur Sterilhaltung von Heilseren in einer vergleichenden Untersuchung Berücksichtigung. Diese Untersuchung scheint uns, ohne den geringsten Anspruch auf Vollständigkeit zu machen, deswegen von Allgemeininteresse, weil sie erneut auf ein dringliches Problem hinweist.

Die wichtigsten Anforderungen, die man nach unserer Meinung an ein gutes Konservierungsmittel stellen muß und auf die wir die im Gebrauch befindlichen Mittel untersuchten, sind folgende:

1. Unschädlichkeit
   maximale Ungiftigkeit
   maximale Reaktionslosigkeit.

2. Desinfizierende Wirkung
   optimale antibiotische Wirkung bei geringer antigenetischer Wirkung.

3. Minimale physikalische, chemische oder biologische Beeinträchtigung des Serums und seiner Wirksamkeit.
   Keine Trübung oder Ausfällung
   Geruchlosigkeit
   Farblosigkeit
   Unveränderlichkeit auch bei langjähriger Lagerung und erheblichen Temperaturschwankungen.

Es darf als bekannt vorausgesetzt werden, daß eine ganze Reihe als gut empfohlener Desinfektionsmittel, eine zwar intensive Wirkung auf die Entwicklung und Vermehrung der Keime haben (entwicklungshemmende oder antigenetische Wirkung), ohne sie jedoch abzutöten (keimtötende oder antibiotische Wirkung). Für die Sterilhaltung von Heilseren müssen wir aber einen Konservator verlangen, dessen antigenetische Wirkung so dicht wie irgend möglich an die keimtötende heranreicht, und zwar aus folgendem Grunde: Keimtötende Mittel, bei denen zwischen antibiotischer und antigenetischer Dosis eine erhebliche Differenz besteht, täuschen in der üblichen Sterilitätsprobe häufig Sterilität vor, die in Wahrheit nicht vorhanden ist. Denn die geringe Menge mitübertragenen Desinfektionsmittels ist zwar noch nicht keimtötend, übt aber schon eine entwicklungshemmende, antigenetische Wirkung aus.

Wir verwendeten für unsere Untersuchung folgende Präparate:

1. das in Deutschland verwendete Phenol,
2. das in Frankreich und Dänemark verwendete Chinosol[1]) (Potassium ortho-oxychinolinsulfonat)[2]),
3. das sich neuerdings in einzelnen Ländern einbürgernde Nipasol[2]) (Monoäthylkarbinylparaoxybenzoat,
4. das in Amerika viel verwandte Merthiolat[3]).

Die Prüfung des letzteren begegnete erheblichen Schwierigkeiten und mußte leider unvollständig bleiben, da die Herstellerfirma bestrebt ist, die Substanz keiner Untersuchung zu unterwerfen. Der Vertreter der Firma stellte uns lediglich eine Verdünnung von 1:1000 zur Verfügung (wofür wir unseren Dank nicht vorenthalten möchten). Doch kann man diese Verdünnung sehr wohl im Vakuum bei 45° C langsam und schonend einengen, bis auf ein Viertel des Volumens.

Zunächst untersuchten wir die Unschädlichkeit der verschiedenen Mittel. Dabei wurde die Toxizität gemessen durch Dosis letalis minimalis an der Maus

1) Riedel-de Haën u. Co. Ltd., Berlin.
2) J. Penner A.G., Berlin.
3) Labs. Lilly Ltd., New-York.

und am Meerschweinchen. Zur Verwendung kamen Mäuse von 15—20 g und Meerschweinchen von 200—300 g. In der folgenden Tabelle I wurden mit † nur diejenigen Tiere bezeichnet, bei denen der Tod innerhalb 48 Std. eintrat.

Tabelle I.

D. l. m.-Bestimmung der gebräuchlichsten Serumkonservierungsmittel.

Phenol	0,01	0,005	0.004	0,003	0,002	0,001 g je 2 Mausen i.v.
1. Tier	†	†	+++†	0	0	0
2. Tier	†	†	+++†	0	0	0

	0,25	0,2	0,1	0,05	0,01 g je 1 Cavia i.m.
	†	+++	+++	0	0

D. l. m. Maus: 0,004
Cavia: > 0,2 < 0,25

Chinosol	0,005	0,003	0,002	0,001	0,0008 g je 2 Mäusen i.v.
1. Tier	†	†	†	0	0
2. Tier	†	†	†	0	0

	0,3	0,25	0,2	0,1	0,05 g je 1 Cavia i.m.
	†	†	0	0	0

D. l. m. Maus: > 0,001 < 0,002
Cavia: > 0,2 < 0,25

Nipasol	0,1	0,05	0,03	0,01 g je 2 Mäusen i.v.
1. Tier	†	†	0	0
2. Tier	†	†	0	0

	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1 g je 1 Cavia i.m.
	†	†	0	0	0

D. l. m. Maus: > 0,03 < 0,05
Cavia: > 0,3 < 0,4

Merthiolat	0,0015	0,0013	0,0012	0,001	0,0005 g je 2 Mäusen i.v.
1. Tier	†	†	†	†	0
2. Tier	†	†	†	0	0

0,001	0,005 g je 1 Cavia i.m.
0	0

D. l. m. Maus: 0,001
Cavia: > 0,005

Zeichenerklärung: +++ = starke Krämpfe; † = Tod innerhalb 48 Std.

Faßt man die Ergebnisse dieser Untersuchung zusammen, so ergibt sich als mindest tödliche Dosis für die verschiedenen Konservierungsmittel:

Tabelle II.

D. l. m.	Phenol	Chinosol	Nipasol	Merthiolat
Maus i.v.	0,004	0,001—0,002	0,03—0,05	0,001
Cavia i.m.	0,2—0,25	0,2—0,25	0,3—0,4	> 0,005
Q (g % : g D. l. m.)	125	33,3	12,5	10

Hieraus folgt, daß Nipasol wesentlich weniger toxisch ist als die anderen Mittel. Jedoch ist das in der reinen Mengenangabe zum Ausdruck kommende Verhältnis trügerisch. Denn man muß natürlich die Giftigkeit in Beziehung

setzen zur im Serum vorhandenen Konzentration. Wir haben die allgemein üblichen Konzentrationen zugrunde gelegt:

Phenol 0,5 %, Chinosol 0,05 %, Nipasol 0,5 %, Merthiolat 0,01 %.

Bildet man aus diesen Werten den

$$\text{Quotienten } Q = \frac{g\%}{D.\,l.\,m.\,g}$$

so ergibt sich hieraus ein klares Bild über die relative Giftigkeit. Wir haben diese Werte in obige Tabelle II eingetragen. Man sieht daraus, wieviel giftiger das Phenol ist als alle anderen Serumzusätze, ein Verhältnis, das sich noch erhöhen würde, wenn man statt der D. l. m.-Werte für die Maus den D. I. m.-Wert für das Meerschweinchen zugrunde legen würde. Das Merthiolat hingegen muß als das ungiftigste der gebräuchlichsten Konservierungsmittel bezeichnet werden.

Für die Feststellung der Reaktionsstärke und die Größe der Gewebsschädigung benutzten wir eine intrakutane Auswertung am Kaninchen. Diese Methode zeichnet sich durch größte Einfachheit und gute Sensibilität aus; ihre Resultate gestatten einen Vergleich zu den Verhältnissen am Menschen. — Es wurden zu diesem Zweck einem Kaninchen verschiedene Mengen der betreffenden Konservierungsmittel jeweils in 0,1 ccm Volumen intrakutan injiziert. Dabei wurde in allem die gleiche Technik befolgt, wie sie zur Diphtherie-Toxin- und Diphtherie-Serumauswertung gebräuchlich ist. Die Ergebnisse finden sich in der folgenden Tabelle III. Sie sind für das Nipasol und für das Merthiolat nur mit Vorbehalt richtig. Denn ersteres ist ziemlich alkalisch und kann schon insofern Reaktionen hervorrufen, von letzterem aber standen uns, wie oben erwähnt, nur sehr hohe Verdünnungen zur Verfügung.

Tabelle III.
Bestimmung von Dosis reagens minima.
Kaninchen intrakutan. Jede Injektion 0,1 ccm Volumen.

Phenol	0,0001	0,0005	0,001	0,005	0,01 g in 0,1 ccm
	+?	6 +	5 n	8 n	10 n
		D. r. m.	0,0085		

Chinosol	0,0001	0,0005	0,001	0,005	0,01 g in 0,1 ccm
	0	?	+	8 n	12 n
		D. r. m.	0,005		

Nipasol Na (stark alkalisch)	0,001	0,005	0,01	0,04	0,1 g in 0,1 ccm
	5 n	5 n	8 N	12 N	
		D. r. m.	0,008		

Merthiolat	0,0001	0,0005	0,001 g in 0,1 ccm
	3 n	7 N	
		D. r. m.	ca. 0,001

Zeichenerklärung (Ablesung nach 18 Std.): 0 = keine Reaktion; + = umschriebene Reaktion; +? = zweifelhafte oder undeutliche Reaktion; n = beginnende Nekrose; N = deutliche Nekrose. Die Zahlen geben den Diameter der Reaktion in mm an.

Tabelle IV.

D. r. m.	Phenol	Chinosol	Nipasol	Merthiolat
Kaninchen i.c. . .	0,0085	0,005	0,008	ca. 0,001
Toxinkoeffizient . (g % : g D. r. m.)	59	10	62,5	ca. 10

Als D. r. m. wurde eine deutlich sichtbare Reaktion von 8 mm Durchmesser bezeichnet. Falls eine solche Reaktion nicht vorhanden war, wurde der Wert durch Interpolieren aus den beiden Nachbarreaktionen entnommen.

Diese Zusammenstellung zeigt am wesentlich empfindlicheren Intrakutantest, wie ungeheuer toxisch das Phenol ist. Eine Feststellung, die wir auch am Menschen zu wiederholten Malen zeigen konnten.

Bei der Messung der Desinfektionskraft kam es uns in erster Linie darauf an, die antibiotische Menge zu bestimmen. Zu diesem Zweck setzten wir einer Reihe von Reagenzgläsern mit je 10 ccm Serum und einem verschiedenen Prozentsatz des Konservierungsmittels je 0,1 ccm einer Emulsion von 600 Millionen Keimen pro ccm zu. Diese war aus Staphylokokken, Streptokokken und Coli zu ungefähr gleichen Teilen gemischt. Nach reichlichem Durchmischen mußten also in 0,1 ccm jeder Serumprobe 600000 Keime enthalten sein. Diese Menge war nötig, um die Gewähr zu haben, daß wirklich mit jeder entnommenen Oese genügend Keime entnommen und überimpft wurden. Denn wir haben

Tabelle V.

	Sterilhaltung Je 10,0 ccm Diphtherieserum + angegebene Menge des jeweiligen Konservierungsmittels offen in Tubus von 16 mm Durchmesser					Infektion Je 10,0 ccm Diphtherieserum + angegebene Menge des jeweiligen Konservierungsmittels + 60 Millionen Keime (Coli, Staphylo- und Streptokokken)			
Phenol Proz.	0,1	0,3	0,4	**0,5**	0,6	0,3	0,4	**0,5**	0,6
1. Tag	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2. Tag	+	+	0	.	.	+	0	.	.
3. Tag	.	.	+	.	.	.	0	.	.
4. Tag	.	.	0	.	.	.	+	.	.
später	+	+	0	0	0	+	+	0	0

Chinosol Proz.	0,01	0,02	0,03	0,04	**0,05**	0,04	**0,05**	0,075	0,08	0,1	0,12
1. Tag	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2. Tag	+	0	.	.	.	+	+	0	0	0	.
3. Tag	.	0	.	.	.	.	.	0	0	0	.
4. Tag	.	0	.	.	.	.	.	+	+	+	.
später	+	+	0	0	0	+	+	+	+	+	0

Nipasol Proz.	0,1	0,2	0,3	0,4	**0,5**	0,25	**0,5**	0,75	1,0
1. Tag	0	0	0	0	0	+	0	0	0
2. Tag	+	0	.	.	.	.	0	.	.
3. Tag	.	0	.	.	.	.	0	.	.
4. Tag	.	+	0	.	.	.	0	.	.
später	+	+	+	0	0	+	+	+	0

Merthiolat Proz.	0,001	0,002	0,003	0,004	0,001	0,003	0,004	0,005	0,006
1. Tag	0	0	0	0	+	+	0	0	0
2. Tag	+	+	.	+	.	+	.	.	.
3. Tag	+	+	.	.	.	+	+	.	.
4. Tag	+	+	.	.	.	+	+	.	.
später	+	+	0	0	+	.	+	0	0

2 Kontrollen	I	II	
1. Tag	0	+	NB. Die vorgeschriebenen resp. üblichen Prozentsätze sind fett gedruckt.
2. Tag und folgende	+	+	

jeweils nur 1 Oese übertragen, da man die entwicklungshemmende Wirkung des im Serum enthaltenen und mitübertragenen Konservierungsmittels nur durch Ueberimpfung einer möglichst kleinen Menge weitgehend ausschalten kann. Aus diesem Grunde wurde die entnommene Oese auch in 20 ccm Bouillon überimpft. Natürlich hat man auch so den dieser Technik innewohnenden Fehler nicht vollständig ausgeschaltet, aber man hat ihn doch auf ein Minimum herabgesetzt, so daß die Ergebnisse dieser Methode wenigstens als annähernd richtig angesehen werden können. — Um aber auch einen Eindruck zu haben, wie sich ein Konservierungsmittel unter mehr den natürlichen Verhältnissen angepaßten Bedingungen verhält, haben wir jeweils auch eine zweite völlig gleiche Reihe mitlaufen lassen, mit dem einzigen Unterschied, daß zu dieser Reihe keine Bakterienemulsion zugefügt wurde. Statt dessen blieben die Tuben von 16 mm Durchmesser offen im Laboratorium stehen und 10 Tage lang wurde von beiden Reihen täglich eine Oese entnommen und in Bouillon und Agar übertragen. Falls im Serum ein verdächtiger Bodensatz oder ein Oberflächenhäutchen vorhanden war, wurde immer das suspekte Material übertragen. Die beimpften Bouillon- und Agarröhrchen wurden 8 Tage beobachtet und in verdächtigen Fällen wurde ein Ausstrich gemacht oder auch eine zweite Ueberimpfung vorgenommen (um jede antigenetische Wirkung auszuschließen). Fast alle Versuche wurden mehrmals ausgeführt und nachkontrolliert. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt (Tab. V). Mit „Sterilhaltung" ist die Serie bezeichnet, die außer dem Zusatz des Konservierungsmittels nichts weiter enthält und mit „Infektion" die Reihe, bei der man beim Ansetzen des Versuches 60 Millionen Keime zugefügt hat.

Nimmt man jeweils das Mittel zwischen der Dosis, die eben noch zur Sterilität hinreichte, und derjenigen, die eine Infektion bis zum 10. Tag nicht ausschließen konnte, zeitigte dieser Versuch folgendes Ergebnis:

Tabelle VI.

	Zur Sterilität erforderliche Menge			
	Phenol g%	Chinosol g%	Nipasol g%	Merthiolat g%
Sterilhaltung	0,4	0,025	0,35	0,0025
Infektion	0,45	0,11	0,88	0,005
TQ (g% : g D. l. m.) . .	112	73	22	5
RQ (g% : g D. r. m.) . .	51	22	110	5

Es ist rein logisch naheliegend und auch durch einige frühere Versuche bestätigt, daß sich in dem sog. „Sterilhaltungs"versuch — wenn auch nicht allein und nicht fehlerfrei — doch die antigenetische Wirkung der verschiedenen Substanzen sehr viel deutlicher zum Ausdruck kommt als in dem „Infektions"versuch. Dies schon allein darum, weil es sich um kleinere Mengen der Konservierungsmittel handelt, bei denen die antigenetische Wirkung überhaupt erst richtig zur Geltung kommen kann. Es geht aus Tabelle VI hervor, daß in dieser Beziehung ziemliche Unterschiede im Wert der einzelnen Mittel bestehen. (Wir werden auf diese Tatsache noch in einer späteren Arbeit zurückkommen.) So ist z. B. im „Infektions"versuch mehr als 5mal soviel Chinosol erforderlich als im „Sterilhaltungs"versuch. Das spricht für eine hohe antigenetische Wirkung des Chinosols, die leicht Sterilität vortäuschen kann. In der Tat wird der Wert des Chinosols hierdurch stark be-

einträchtigt. In die letzte Spalte der Tabelle VI haben wir nunmehr den Quotienten $TQ = \frac{g\%}{g\,D.\,l.\,m.}$, so eingesetzt, wie er sich auf Grund unserer Untersuchung ergibt, wobei in den Zähler die für den Infektionsversuch nötig gewesene Substanzmenge eintrat. Diese Resultate geben nunmehr ein deutliches Bild über den wirklichen Wert des Konservierungsmittels. Es zeigt sich in der Tat, daß Phenol das schlechteste der untersuchten Schutzmittel ist. Allein, es ist allen anderen dadurch überlegen, daß seine antigenetische Dosis dicht an die antibiotische Dosis heranreicht, während hier gerade die Schwäche des sonst an sich ausgezeichneten Chinosols liegt. Wir haben außerdem auch den Reaktionskoeffizienten RQ eingezeichnet, der das Bild noch klarer macht.

Lassen sich die beiden Hauptbedingungen eines Konservierungsmittels, Unschädlichkeit und desinfizierende Wirkung einigermaßen objektiv messen und demonstrieren, so sind Trübung und vor allem Geruch und Farbe usw. eine rein subjektive Feststellung. Aber darüber hinaus sind sie auch von einem Serum zum anderen, ja von einer Entblutung zur anderen überaus schwankend, je nach p_H, Eiweißgehalt und ähnlichen das Serum beeinflussenden Faktoren. Wir haben deswegen darauf verzichtet, etwa eine größere Anzahl von Seren kolorimetrisch oder nephelometrisch auf die durch das Konservierungsmittel hervorgerufenen Veränderungen zu untersuchen. Wir haben lediglich das Sediment von verschiedenen Konzentrationen in 10,0 ccm Serum nach 6tägigem Abstehen grob gemessen und Geruch und Farbe rein subjektiv festgestellt.

Tabelle VII.

Konzentration	0,05proz.	0,1proz.	0,5proz.	1,0proz.
Phenol				
Sediment . . .	0,05	0,07	0,3	1,0
Farbe	keine	keine	keine	keine
Geruch	sehr schwach	etwas stärker	ziemlich stark	sehr stark
Klarheit . . .	klar	klar	trüb	sehr trüb
Nipasol				
Sediment . . .	Spuren < 0,02	Spuren < 0,04	Spuren < 0,05	ca. 0,1
Farbe	keine	keine	keine	keine
Geruch	kein	kein	kein	schwach
Klarheit . . .	klar	fast klar	trüb	ziemlich trüb
Chinosol				
Sediment . . .	Spuren < 0,02	Spuren ca. 0,02	0,07	ca. 0,15
Farbe	schwach grünl.	grünlich	ziemlich grünlich	stark grünl. opal.
Geruch	kaum	wenig	ziemlich	stark
Klarheit . . .	etwas trüb	trub	ziemlich trüb	stark trüb
Merthiolat				
Sediment . . .	Spuren < 0,15			
Farbe	keine			
Geruch	kein	?	?	?
Klarheit . . .				

Auch bei diesen Angaben muß natürlich wieder die im Serum übliche Konzentration berücksichtigt werden, die z. B. für das Chinosol nur $^1/_{10}$ so hoch ist, wie für das Phenol oder Nipasol. Es erhellt daher aus dieser Zusammenstellung deutlich, daß Merthiolat allen anderen Konservierungsmitteln in bezug auf Depotbildung, Farbe und Geruch wesentlich überlegen ist. Ihm

folgt in erheblichem Abstand Chinosol, während Nipasol und besonders Phenol bei weitem nicht so geeignet sind.

Um ein abgerundetes Bild zu geben, sei die wirtschaftliche Seite ebenfalls berücksichtigt. Denn ein brauchbares Konservierungsmittel muß sich auch im Preise in erschwinglichen Grenzen halten. Dabei stehen unter Berücksichtigung der hiesigen Preise die verschiedenen Substanzen in folgendem Verhältnis:

Phenol : Chinosol : Nipasol : Merthiolat = 1 : 22 : 28 : 1000.

Dieser ganz erhebliche Unterschied verringert sich sofort, wenn man der Berechnung die für ein Liter Serum gebräuchliche Menge zugrunde legt, dann ergibt sich nämlich folgendes Verhältnis:

Phenol : Chinosol : Nipasol : Merthiolat = 1 : 2,2 : 28 : 20.

Es zeigt sich also, daß Merthiolat gleichwohl noch billiger ist als das Nipasol.

Da es scheint, daß bei allen untersuchten Mitteln ein wesentlicher Einfluß auf den Antitoxintiter in dem üblichen Prozentsatz nicht besteht, haben wir bei unserer Untersuchung hiervon zunächst abgesehen.

Wir enthalten uns bewußt, aus dieser keineswegs vollständigen Untersuchung ein bestimmtes Konservierungsmittel zu empfehlen, zumal da der Gebrauch eines solchen auch stark abhängig ist von den lokalen Verhältnissen, Klima, Gesetzgebung usw. Doch scheint uns aus unserer Untersuchung folgendes sehr deutlich hervorzugehen:

1. Das Phenol ist unter allen gebräuchlichen Konservierungsmitteln das am meisten toxische, ohne daß sein Gebrauch durch eine entsprechende antibiotische Wirkung gerechtfertigt wäre.

2. Das neuerdings in Gebrauch gekommene Nipasol hat vor dem Phenol nur den Vorteil geringerer Giftigkeit; ist aber z. B. dem Chinosol im wesentlichen unterlegen.

Im ganzen glauben wir, daß keines der untersuchten und keines der im Gebrauch befindlichen Konservierungsmittel den Anforderungen der Praxis in idealer Weise entspricht. Die Schaffung eines guten Mittels zur Sterilhaltung biologischer Produkte, insbesondere von Heilseren, stellt eine ebenso wichtige wie schwierige Aufgabe, die der Zusammenarbeit von Immunologen und Chemikern ein dankbares Feld bietet.

Zusammenfassung.

Phenol, Chinosol, Nipasol-Natrium und Merthiolat wurden auf Unschädlichkeit (D. l. m. und D. r. m.), desinfizierende Wirkung, sowie Depotbildung und Veränderung des Serums untersucht.

Dabei ergab sich, daß Phenol ein sehr ungeeignetes und sehr toxisches Konservierungsmittel ist. Nipasol-Na ist ihm kaum überlegen. Chinosol und vor allem Merthiolat hatten unter den untersuchten Substanzen die besseren Eigenschaften.

NB. Ein großer Teil der technischen Untersuchungen wurde in sehr gewissenhafter Weise von der Laborantin Else Marx ausgeführt.

[Aus der Lehrkanzel für Bakteriologie und Tierhygiene der Tierärztlichen Hochschule in Wien (Vorstand: Prof. Dr. Hans David).]

Zum „Kaltsterilisierverfahren nach Schweizer“.

Von Dr. med. vet. Alfred Ordelt.

Mit 1 Abbildung im Text.

G. Schweizer hat in seiner „Einführung in die Kaltsterilisationsmethode“ ein Verfahren beschrieben, das sich desinfektorisch wirksamer, flüchtiger chemischer Stoffe, hauptsächlich Narkotika, bedient. Diese werden bei Zimmertemperatur im Vakuum zur Verdampfung gebracht und in Dampfform, je nach dem Mittel verschieden lang, auf das zu sterilisierende Material einwirken gelassen. Durch dieses Verfahren sollen Zustandsänderungen des Materiales, wie sie z. B. bei den üblichen Methoden der Hitzesterilisation erfolgen, vermieden werden. Das Schweizersche Verfahren der Kaltsterilisation würde daher besonders bei der Nährbodenbereitung und für die Medikamentensterilisation den Vorteil bieten, daß auch hitzeempfindliche Substanzen ohne Aenderung ihres physikalischen oder chemischen Gefüges oder ihrer biologischen Eigenschaften entkeimt werden könnten.

Von den nach Schweizer verwendbaren Sterilisationsmitteln und ihren Gemischen samt ihrer besonderen Verwendungseignung seien folgende angeführt:

1. Azeton oder Methyläthylketon mit Zusätzen von Aether, Jodoform, Chloroform, Aethylenchlorid, Senföl usw. Zur Sterilisation von Kleie, Brot, Mehl, Milch, Blut, Organen, Harn usw.

2. Aethyl- oder Methylalkohol mit Zusätzen von Aether, Jodoform, Formaldehyd, Borsäure usw. Anwendungsgebiet: chirurgische Instrumente, Nadeln, Katheder, Tampons, Seide, Katgut, Papier, Leder, Holz, Torf usw. (zerstört jedoch kolloidale Lösungen).

3. Aethyläther mit Zusätzen von Chloroform, Azeton, Piridin, Senföl, Schwefelkohlenstoff, Aethylenchlorid usw. Anwendung wie 1.

4. Wässeriges konzentriertes Ammoniak ohne Zusätze. Anwendung: Mist, Holz, Brot, Getreide, Kartoffel, Rüben, Eiweißlösungen ohne Enzymtätigkeit, Gummiartikel usw. (hemmt die Enzymtätigkeit vorübergehend sehr stark).

5. Chloroform mit Zusätzen von Aether, Azeton, Ol. therebinthinae, Methylenchlorid, Aethylenchlorid, Phosgen usw. Anwendung: wie 1.

6. Formaldehyd solut. 40 Proz. ohne Zusatz. Anwendung: Mist, Holz, Torf, Verbandsstoffe, chirurgische Instrumente usw. (allgemeines Enzymgift in konzentrierter Form).

Nach Schweizer war z. B. die Sterilisationswirkung von Methylenchlorid folgende:

Bac. Subtilis + Sporen wurden abgetötet durch:

je 2 ccm Methylenchlorid auf 1 ccm Luftraum: in 9½ Std.
je 2 ccm „ „ 1 „ stark luftverdünnten Raum: in 4½ Std.
je 2 ccm „ „ 1 „ stark luftverdünnten Raum samt O-Entzug: in 2½ Std.

Sarcina ventriculi konnte durch Methylenchlorid, bei gleicher Versuchsanordnung, in noch kurzerer Zeit abgetötet werden.

Penicillium glaucum war mit je 1 ccm Chloroform auf 1 Liter Luft nach 9 Std., mit einem Gemisch von je 0,5 ccm Chloroform + 0,5 ccm Methylal schon nach ca. 5 Std. abzutöten.

Tierische Fäzes sterilisiert Schweizer auch in der Weise, daß er sie mit Ammoniak verreibt und dieses dann im Kaltsterilisator wieder absaugt.

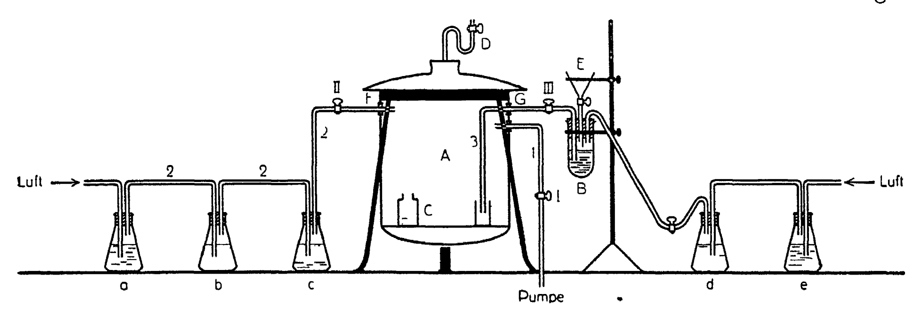


Abb. 1. Untersuchungen über die Schweizersche „Kaltsterilisationsmethode". Skizze der eigenen Anlage. *A* = Sterilisationsraum. *B* = Behalter für Sterilisationsmittel. *C* = Fläschchen mitKOH + Pyrogallol. *D* = Manometer. *F* u. *G* = Glasstutzen. *1* = Pumpenleitung. *2* = Luftzuleitung. *3* = Leitung f. d. Sterilisationsmittel. *I*, *II*, *III* = Quetschhähne. *a*, *b*, *c*, *d* und *e* = Vorlage mit KOH + Pyrogallol.

Bei der Kaltsterilisation, die in dem auf der Skizze (Abb. 1) beschriebenen, selbst hergestellten Apparat vorgenommen wurde, ist folgender Arbeitsgang eingehalten worden:

Das zu untersuchende Material wird in das Gefäß (*A*) eingebracht und der Apparat mit dem Deckel luftdicht verschlossen. Nachdem die Oelluftpumpe in Betrieb gesetzt wurde, wird der Quetschhahn (*I*) geöffnet und das 10 Liter fassende Glasgefäß (*A*) evakuiert. Dann wird zuerst der Quetschhahn geschlossen und hierauf die Pumpe abgestellt. Nun wird durch Oeffnen des Quetschhahnes (*II*) Luft in den Behälter (*A*) einströmen gelassen, die durch drei Vorlagen geleitet wurde, die mit je 200 g einer Mischung von 20 Proz. KOH + 3 Proz. Pyrogallol gefüllt sind. In den drei Vorlagen (*a*, *b*, *c*) soll nach Schweizer die einströmende Luft von Sauerstoff, Kohlensäure und Keimen befreit werden. Dieser Vorgang des Evakuierens und nachfolgenden Einströmenlassens von (nach Schweizer gereinigter) Luft wird drei- bis viermal wiederholt. Dadurch soll den Proben ihr normaler Luftgehalt soweit entzogen werden, daß die Sterilisationsdämpfe ungehindert in das Versuchsgut eindringen können. Nach dem letzten Evakuieren wird der Quetschhahn (*III*) geöffnet, wodurch das Sterilisationsmittel in den Behälter (*A*) einströmt und dort verdampft. Bei geschlossenen Hähnen werden nun die vergasten Sterilisationsmittel verschieden lang auf das Sterilisationsgut einwirken gelassen. Fallweise wird neuerlich evakuiert und neue Mengen des Sterilisationsmittels in die Apparatur eingelassen werden. Das Vakuum wurde bei der Aufstellung der Apparatur fachmännisch geprüft und vor jedem Versuch nachkontrolliert.

Die in den vorliegenden Versuchen verwendeten Mengen und Einwirkungszeiten der Desinfektionsmittel auf das Desinfektionsgut sind von G. Schweizer als wirksam gefunden worden. Die Entfernung des Desinfektionsmittels wird so vorgenommen, daß der Behälter (*A*) wieder evakuiert, und dann durch die Leitung (*2*) gereinigte Luft einströmen gelassen wird. Auch dieser Vorgang wird drei- oder viermal wiederholt. Das Gefäß (*A*) darf zur Entnahme der Proben erst dann geöffnet werden, bis in (*A*) der äußere Luftdruck erreicht ist. Das im Behälter (*A*) befindliche Fläschchen (*C*) hat die Aufgabe, durch die darin befindliche Pyrogallollösung den restlichen Sauerstoff zu binden. Außer der hier erläuterten Methode verwendet Schweizer noch eine andere, die darin besteht, daß er das Sterilisationsmittel dem Versuchsgut zusetzt und nach kurzer Einwirkungsdauer aus diesem durch mehrmaliges Evakuieren wieder entfernt.

Die von mir angestellten Versuche wurden in der beigeschlossenen Tabelle nach den 10 verwendeten Sterilisationsmitteln geordnet und ihrer gleichen Versuchsanordnung nach, in 7 Gruppen mit den Ziffern I—VII bezeichnet, eingeteilt. In den Rubriken der Tabelle: Verbrauch, Zeit und Wachstum bedeuten die Eintragungen der Reihe nach:

1. Verbrauch des Sterilisationsmittel in Kubikzentimetern; das liegende Kreuz (×) den mit den Dämpfen des entsprechenden Sterilisationsmittels gesättigten Raum.
2. Die Einwirkungsdauer des Mittels in Stunden.
3. +++ üppiges Wachstum, d. h. keine Sterilisationswirkung.
   ++ geringe Keimverminderung, schwache Sterilisationswirkung.
   ± spärliches Wachstum, starke Keimverminderung.
   — kein Wachstum, vollständige Keimtötung.

Ein Beispiel aus der Tabelle (Gruppe V a):

Sterilisationsmittel: Aether + Azeton + Chloroform.

Versuchsgut: wässeriger Organauszug; Herstellung von 14 Plattenkulturen, auf welche im Sterilisator 5 ccm des Sterilisationsmittels einwirken gelassen wurden. Nach einer Stunde Entnahme des ersten Plattenpaares; auf die restlichen Platten wurden neuerdings 5 ccm des Desinfektionsmittels einwirken gelassen und abermals zwei Platten entnommen usw. Nach jeder Entnahme betrug die Zugabe des Mittels 5 ccm, wogegen die Einwirkungszeiten ungleich lang gewählt wurden. Das 5. Plattenpaar war z. B. 2mal durch 1 Std.. 2mal durch 2 Std. und 1mal durch 9 Std. je 5 ccm des Mittels ausgesetzt, im ganzen also 15 Std. und 25 ccm des Desinfektionsmittels.

Gruppe I. Sterilisation von Bouillonkulturen.

Von 24—48 Std. Bouillonkulturen wurde zum Keimnachweis vor und nach dem Sterilisationsversuch auf je 3 Platten ausgestrichen und diese durch 48 Std. bebrütet.

Gruppe II. Sterilisation von Schrägagarkulturen.

Die Versuche mit Schrägagarkulturen wurden in gleicher Weise wie in Gruppe I vorgenommen.

Gruppe III. Sterilisation von Keimträgern.

24 Std. Schrägagarkulturen wurden mit je 10 ccm phys. Kochsalzlösung abgeschwemmt; in die Suspensionen wurden Fäden aus chirurgischer Seide Nr. 10 und Katgut Nr. 2 eingelegt. Nach einer Stunde wurden die Fäden herausgenommen und im Brutschrank bei 37° getrocknet. Ein Teil dieser Seiden- und Katgut-Fäden wurden zu je zwei Stück ohne vorherige Behandlung in Bouillon bebrütet, der andere Teil verschieden lang der Ein-

Desinfektions-mittel	Gruppe	Versuchsgut	Verbrauch in ccm	Zeit in Stunden	Wachstum	Verbrauch in ccm	Zeit in Stunden	Wachstum	Verbrauch in ccm	Zeit in Stunden	Wachstum	Verbrauch in ccm	Zeit in Stunden	Wachstum	Verbrauch in ccm	Zeit in Stunden	Wachstum	Versuchs-ergebnis
1 Aethyläther $(C_2H_5)_2O$	I	Bac. subtilis (versport)	10	8	+++	20	12	+++										—
	II	Bact. mallei	10	8	+++	20	12	+++										—
	II	Bact. Paratyphus A	10	8	+++	20	12	+++										—
	I	Bact. pseudotub. rodent.	10	8	+++	20	12	+++										—
2 Aethylenchlorid CH_2Cl-CH_2Cl	VI	Fleisch, Leber, Hirn, Kot, Ei	20	8	+++	40	12	+++										—
3 Ammoniak	IV	Staph. pyogenes aureus	×	2	+++	×	4	+++	×	6	+++	×	12	+++				—
	IV	Bac. subtilis (versport)	×	2	+++	×	4	+++	×	6	+++	×	12	+++				—
4 Methylenchlorid $CH_2 \cdot Cl_2$	II	Bac. subtilis (versport)	20	9	+++	50	16	+++										—
	III	Staph. } + {Seide	20	9	+++	50	16	+++										—
	III	pyogen. aureus} {Catgut	20	9	+++	50	16	+++										—
	III	Bac. subrilis } + {Seide	20	9	+++	50	16	+++										—
	III	(versport) } {Catgut	20	9	+++	50	16	+++										—
	Va	Organ- } + { Plattenkult.	10	2	++	20	4	+	30	6	±	40	14	—	50	16	—	+
	Vb	auszug } { Schüttelkult.	10	2	++	20	4	+	30	6	+	40	14	±	50	16	—	+
5 Formaldehyd H·CHO 40 Proz.	III	Staph. } + {Seide	×	2	—	×	4	—	×	11	—							+
	III	pyogen. aureus} {Catgut	×	2	—	×	4	—	×	11	—							+
	III	Bac. subtilis } + {Seide	×	2	+	×	4	—	×	11	—							+
	III	(versport) } {Catgut	×	2	+	×	4	—	×	11	—							+
	IV	Organauszug (wie V)	×	4	—	×	6	—	×	18	—							+
	Vb	Organauszug	×	4	—	×	6	—	×	18	—							+
6 Aether Aceton āā 8 ccm Methylenchlorid 5 ccm	IV	Strept. pyogen.	20	12	+++													—
	II	Bact. Paratyphus A	20	12	+++													—
	IV	Bac. subtilis (versport)	20	12	+++													—
7 Aether Aceton āā 20 ccm Jodoform 0.01g	I	Bact. pseudotub. rodent.	10	8	+++	20	12	+++										—
	II	Bact. mallei	10	8	+++	20	12	+++										—
	II	Bact. Paratypus A	10	8	+++	20	12	+++										—
	II	Bac. subtilis (versport)	10	8	+++	20	12	+++										—
	VI	Fleisch, Leber, Hirn, Kot, Ei	20	8	+++	40	12	+++										—
8 Aether + Aceton Chloroform āā	Va	Organauszug-Plattenkult.	5	1	+++	10	2	++	15	4	++	20	6	+	25	15	±	+
			30	20	—	35	24	—										
9 Petroläther	VII	Organauszug (wie V)	0.1	1/2	+++													—
10 Petroläther 10 ccm + Ol Sinapis gtt V.	VII	Organauszug (wie V)	0.1	1/2	+++													—

wirkung wechselnder Mengen von Sterilisationsmitteln ausgesetzt und dann gleichfalls in Bouillon eingebracht und bebrütet.

Gruppe IV. Sterilisation von Bakteriensuspensionen verschiedener Konzentration.

Die Suspension wurde durch Abschwemmung von 24 Std. Schrägagarkulturen mit phys. Kochsalzlösung hergestellt. Die weiteren Verdunnungen dieser Abschwemmung von 1:100 bis 1:1 Million wurden gleichfalls mit phys. Kochsalzlösung bereitet. Der Keimgehalt der verschieden konzentrierten Suspensionen wurde durch Ausstreichen von 0,5 ccm auf Agarplatten ermittelt. Je 5 ccm der Verdünnungen wurden in Röhrchen nach dem Schweizerschen Verfahren zu sterilisieren versucht und es wurden danach mit dem Versuchsmaterial wieder Platten gestrichen.

Gruppe V. Sterilisation von Auszügen aus leicht faulem Organmaterial.

a) In dünner Schicht (Plattenkultur): Das Organmaterial wurde durch 12 Std. bei Zimmertemperatur in phys. Kochsalzlösung eingelegt. Mit dem filtrierten Auszug wurden 18 Agarplatten mit je 1 ccm gestrichen; 4 davon wurden sofort bebrütet, während die anderen in den Kaltsterilisator eingebracht wurden.

b) in hoher Schicht (Schüttelkultur): Durch Zusatz von 1 ccm des Auszuges zu verflüssigtem und auf 42° abgekühltem Agar wurden Schüttelkulturen zu Platten verarbeitet und der Versuch wie unter V a durchgeführt.

Gruppe VI. Sterilisation von verschiedenem organischen Material.

Fleisch, Leber Hirn, Kot und Ei wurden mit phys. Kochsalzlösung dünnbreiig verrieben und zu sterilisieren versucht. Vor und nach dem Sterilisationsversuch wurden zur Kontrolle auf Agarplatten Kulturen angefertigt.

Gruppe VII. Sterilisationsversuch mit, dem Versuchsgut beigemischten, Sterilisationsmitteln.

Von den wie in Gruppe V hergestellten Fleischauszügen wurden Verdünnungen von 1/5 bis 1/625 hergestellt und mit diesen Plattenkulturen angelegt. Zur Sterilisation wurde zu je 5 ccm der Verdünnungen 0,1 ccm des Desinfektionsmittels zugesetzt und nach Ablauf der Einwirkungszeit zur Feststellung der Keimverminderung wieder Plattenkulturen hergestellt. Bemerkt sei schließlich noch, daß Kultivierungsversuche auf Agarplatten, die mit Formaldehyd behandelt wurden (siehe Versuch V b), mißlangen. Formaldehyd veränderte diese so weit, daß seine Verwendung zur Kaltsterilisation von Nährböden nicht in Betracht kommt.

Ueber den Ausfall der Versuche gibt vorstehende Tabelle Aufschluß (siehe Tabelle!).

Zusammenfassung.

Aus den vorliegenden Versuchen geht hervor, daß mit dem Kaltsterilisationsverfahren nach Schweizer eine sichere Entkeimung nicht zu erreichen war. Diese unbefriedigenden Versuchsergebnisse decken sich mit jenen, die Jan Smit und C. J. Schooneveldt v. d. Kloess mit der Schweizerschen Kaltsterilisationsmethode erhalten haben.

Schrifttum.

Schweizer, G., Einführung in die Kaltsterilisationsmethode. Jena, G. Fischer, 1937. — Smit, Jan, u. Schooneveldt v. d. Kloess, C. J., Kaltsterilisierung. Pharm. Weekbl. **73**, 978 (1936); Chem. Zbl. **1**, 2215.

[Aus der Seuchenabteilung des Instituts Robert Koch Berlin
(Abteilungsleiter: Prof. Dr. Wohlfeil).]

Untersuchungen über das Wesen der pathogenen Wirkung des Milzbranderregers[1]).

Von H. Peter, Assistent.

Mit 6 Abbildungen im Text.

Ueber die Todesursache der Milzbranderkrankung weiß man, daß der Erreger eine Septikämie hervorruft, und daß diese zum Tode führt. Zahlreiche Arbeiten der letzten Zeit haben den Weg des Erregers von der lokalen zur Allgemeininfektion geklärt (Gins, Uchida, Boquet u. a.), aber nicht die eigentliche Ursache für das Eindringen der Milzbrandkeime in Gewebe und Blutbahn aufdecken können. Fast mit Sicherheit kann man die Bildung spezifischer Toxine durch diese Erreger ablehnen; die Vielheit und Verschiedenheit der in großer Zahl isolierten Giftstoffe (Hoffa, Hankin, Brieger u. C. Fraenkel u. a.) weist darauf hin, daß es sich nicht um primäre Bakterientoxine, sondern um toxische Zersetzungsprodukte aus den Nährmedien handelt.

Von Wohlfeil ist auf Grund eigener Untersuchungen die Theorie aufgestellt worden, daß die Entstehung und der Verlauf von Infektionskrankheiten, wenigstens in einem Teil, durch die Erregerfermente verursacht würden. Wohlfeil u. Wollenberg haben die Bedeutung der proteolytischen Fermente des Milzbranderregers für seine pathogene Wirkung aufzuzeigen versucht: Sie behandelten mit Milzbranderregern infizierte Meerschweinchen mit Monojod-Essigsäure, einer die proteolytischen Fermente hemmenden Verbindung, und erzielten damit eine deutliche lebensverlängernde Wirkung. So war der mittelbare Beweis erbracht, daß mindestens ein Teil der Krankheitsprozesse durch die Fermente des Milzbrandbazillus verursacht wird.

Diese Ergebnisse sollten auf breitester Grundlage nachgeprüft und einige noch offene Fragen geklärt werden, so z. B. ob die übrigen Halogen- und die Cyan-Essigsäure ähnliche Wirkungen hätten. Für diese Versuche habe ich weiße Mäuse und den gleichen Milzbrandstamm 1800 verwendet, mit dem auch Wohlfeil u. Wollenberg infiziert hatten. Er tötete in Dosen von ½ Oese Mäuse in 10—24 Std. mit Sicherheit. Es wurde in der Regel subkutan mit höchstens 20 Std. alten Agarkulturen infiziert, so daß nur mit einer geringen Versporung gerechnet zu werden brauchte. Die Halogen-Essigsäuren (= Halogen-E.) wurden vor der Injektion auf neutrale Reaktion eingestellt,

1) IV. Mitteilung im Rahmen einer Arbeitsreihe von T. Wohlfeil: „Ueber Hemmung und Förderung bakterieller Fermente im infizierten Tierkörper.“
Nach einem am 12. Dezember 1938 vor der Berliner Mikrobiologischen Gesellschaft gehaltenen Vortrag.

um die Säurewirkung auszuschalten. In Toxizitätsversuchen war ermittelt worden, daß bei Verwendung isomolekularer Lösungen etwa 10fach höhere Dosen von Chlor- und Cyan-E. vertragen wurden als von Jod- und Brom-E., und daß man bei wiederholter Injektion kleinerer Mengen unter der toxischen Schwelle der Jod- und Brom-E. bleiben konnte. Die mitgeteilten Versuche sind Beispiele aus den jeweiligen Gruppen. Sie wurden an insgesamt mehr als 400 Tieren durchgeführt.

In der ersten Gruppe wurden Mäuse mit $^1/_{10}$ Oese Milzbrandbazillen infiziert und mit großen Dosen (0.3 ccm n/10 Lösung) von Chlor- und Cyan-E. gespritzt (Abb. 1): Die durchschnittliche Lebensdauer betrug bei den unbehandelten Kontrollen 38, bei den Chlor-E.-Tieren 83 und bei den Cyan-E.-Tieren 51 Std. Auch bei den übrigen Versuchen dieser Gruppe wurde eine solche deutliche lebensverlängernde Wirkung besonders der Chlor-E. festgestellt.

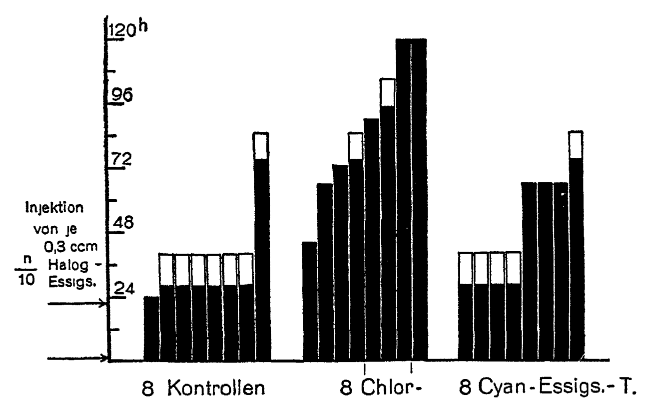


Abb. 1. Die schwarzen Saulen stellen die Lebenszeit der Tiere, die weißen Rechtecke die Nachtzeit dar, in der nicht beobachtet wurde.

Das gleiche Ergebnis hatte eine weitere Gruppe, bei der mit wiederholten Injektionen kleiner Mengen von Halogen-E. gearbeitet wurde (Abb. 2).

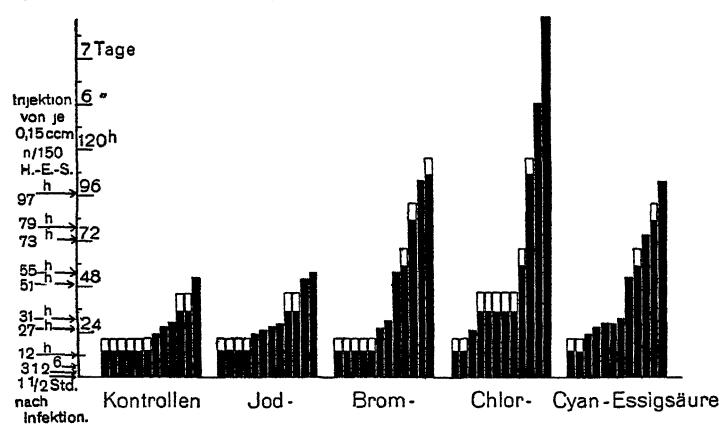


Abb. 2. Injektion der Tiere mit $^1/_2$ Oese Milzbrandagarkultur subkutan am Bauch.

Der abgebildete Versuch mit 60 Tieren zeigte folgende durchschnittliche Lebenszeiten: Kontrollen 26, Jod-E.-Tiere 29, Brom-E.-Tiere 47, Cyan-E.-Tiere 46 Std. Ein Tier der Chlor-E.-Reihe hat die gewaltige Infektion mit ½ Oese Milzbrandbazillen sogar überstanden und lebte wochenlang bis zur absichtlichen Tötung. Die Lebenszeit der Cl-E.-Tiere ist somit noch bedeutend länger als bei allen übrigen.

Es wurden weiter Veränderungen der Behandlungsart vorgenommen. Dabei ergab sich, daß eine einmalige Fruhbehandlung (15 Min. nach Infektion mit ½ Oese Milzbrandbazillen) mit 0,15 ccm n/100 Chlor-E. fast wirkungslos ist. Die einmalige Spätbehandlung (6 Std. nach Infektion mit ½ Oese) mit 0,4 ccm n/150 Chlor-E. ergab eine geringe lebensverlängernde Wirkung. Weiter zeigte sich, daß die Vorbehandlung mit den Halogen-E. fast wirkungslos ist, selbst wenn später subkutan weiterbehandelt wird.

In der nächsten Versuchsgruppe ergab sich, daß die intravenöse Zufuhr der Halogen-E. schlechter wirkte als die bisher aufgezeigte subkutane. Am besten war die intraperitoneale Behandlung, die die Wirkung der subkutanen in bezug auf die Lebenszeitverlängerung noch um 30 Proz. übertraf.

Diese Unterschiede habe ich mir folgendermaßen zu erklären versucht: Die günstige Wirkung der subkutanen Behandlung beruht wahrscheinlich darauf, daß ein Depot im Unterhautgewebe gesetzt wird, aus dem eine langsame Resorption stattfindet. Dadurch wird der Abbau der Halogen-E. im Tierkörper kompensiert und ein konstanter Spiegel der Halogen-E. im Blut erzeugt, der eine dauernde Beeinflussung der Erreger gewährleistet. Da aber bei der Milzbranderkrankung nach einer von der Infektionsdosis abhängigen Zeit ein Oedem des Unterhautgewebes auftritt, werden spätere subkutane Injektionen fast wirkungslos sein. Denn das Oedem stört die weitere Resorption. Darin ist auch zugleich die Erklärung für die bessere Wirkung der intraperitonealen Behandlung zu sehen, weil bei dieser die Resorption konstant bleibt. Außerdem gelangen die Mittel wegen der leichteren Aufnahme durch die Bauchlymphgefäße in höherer Konzentration in den Körper. Vielleicht spielt auch eine direkte Reizwirkung auf das Retothel eine Rolle.

Besondere Verhältnisse liegen bei der intravenösen Behandlung vor; denn die Mittel gelangen schnell in höchster Konzentration in Blutbahn und Gewebe. Damit schädigen sie wahrscheinlich die Uferzellen des Kreislaufes, die zum Retothel gehören. Dieses spielt aber für die Milzbranderkrankung eine ganz besondere Rolle (Singer, Rewo u. a.), weil es ein wichtiges Abwehrmittel des Körpers gegen die Infektion darstellt. Meine histologischen Untersuchungen ergaben außerdem, daß die Uferzellen des Kreislaufes wahrscheinlich die wichtigste Eintrittspforte für die Milzbranderreger in die Gewebe darstellen, und daß sich an ihnen auch die pathologischen Prozesse abspielen, die zum Tode führen. Weiter setzt bei der intravenösen Injektion vermutlich ein schnellerer Abbau der Halogen-E. ein. Die negative Wirkung der Vorbehandlung ist vielleicht darin zu sehen, daß der nicht infizierte Körper durch die Mittel eine Resistenzverminderung erfährt.

Außer den Abänderungen der Behandlungsart habe ich auch verschiedene Infektionsarten geprüft. Dabei zeigte es sich, daß noch bei Erhöhung der Keimmenge auf ¾ Oese eine Beeinflussung der Infektion möglich ist (Abb. 3). Die Versuche mit kleinen Infektionsdosen ($^1/_{40}$ bis $^1/_{1000}$ Oese) hatten stark wechselnde und uneinheitliche Ergebnisse. Bei einigen gelang es, Tiere durch die Behandlung am Leben zu erhalten, bei anderen war der Erfolg nur gering. Die Uneinheitlichkeit und die zum Teil schlechteren Ergebnisse der Versuche mit kleinen Keimmengen erklären sich wahrscheinlich dadurch, daß bei kleinen Infektionsdosen die Milzbranderkrankung chronisch verläuft. So machen sich schon vor Eintreten des fermenthemmenden Effektes Vergiftungserscheinungen durch die Halogen-E. bemerkbar. Daher sind die Ergebnisse der Versuche mit großen Keimmengen für unsere Fragestellung beweiskräftiger. Bei den kleinen Infektionsdosen zeigte sich aber ein wichtiger Befund. Bisher hatte stets die Chlor-E. die beste Wirkung aufzuweisen. Bei kleineren Keim-

mengen zeigten sich jedoch auch andere Verbindungen am wirksamsten. Daraus glauben wir ableiten zu können, daß bei richtiger Abstimmung von Keimmenge und Behandlungsdosis aufeinander für jede Halogen-E. und fur die Cyan-E. ein Wirkungsoptimum zu erreichen ist. Eine wesentliche Rolle spielt dabei die toxische Wirkung der Verbindungen, die, wie erwähnt, bei der Jod-E. und Brom-E. wesentlich stärker ist als bei den übrigen.

Die Ergebnisse der Versuche mit intraperitonealer Infektion unterschieden sich nicht von denen mit subkutaner. Intravenös wurde nicht infiziert, da dies bei der besonderen Rolle, die das Retothel für die Milzbranderkrankung spielt, unnatürliche Verhältnisse geschaffen hätte.

Bei allen bisherigen Versuchen wurde als Merkmal der Wirkung der Halogen-E. die Verlängerung der Lebenszeit der behandelten Tiere gegenüber den Kontrollen betrachtet. Um sie aber noch weiterhin zu sichern, habe ich

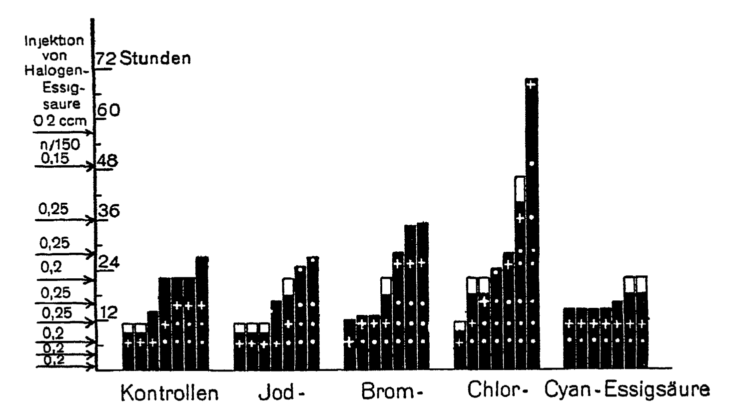


Abb. 3. Die weißen Kreuze bedeuten: Milzbrandbazillen im Blut nachgewiesen. Die weißen Kreise: negativer Bazillenbefund. Aus der Abb. ist zu erkennen, daß zwei Tiere der Jod-E.- und ein Tier der Chlor-E.-Gruppe interkurrent gestorben sind, da auch nach dem Tode keine Bazillen nachweisbar waren.

auch andere Zeichen zur Beurteilung herangezogen. Zunächst prüfte ich die Beeinflußbarkeit des Bazillennachweises im Blut durch die vorgenannten Halogen-E. Dabei ist zu vermerken, daß im Verlauf jeder Infektionskrankheit gelegentliche bakteriämische Schübe auftreten, die mit Sepsis nichts zu tun haben und durch die bakteriziden Kräfte des Blutes unschädlich gemacht werden. Ob dies auch für den Milzbrand zutrifft, ist noch fraglich.

Robert Koch stellte die ersten Keime im Blut 14—16 Std. nach der Infektion fest, während der Nachweis in Organen Pernice und Scagliosi schon 4—6 Std. nach der Infektion gelang.

Wahrscheinlich hängt das erste Auftreten von Bazillen im Blut auch von der Infektionsdosis ab, denn ich konnte mit einfachster Methodik schon $6\frac{1}{2}$ Std. nach Infektion mit $\frac{1}{2}$ Oese Milzbrandbazillen im Schwanzvenenblut nachweisen.

Ziehen wir die erste Feststellung von Bazillen im Blut zur Beurteilung unserer Versuche heran, so bestätigen sie ebenfalls die günstige Wirkung der Halogen-E. auf die Milzbranderkrankung. Meist gelang der erste Nachweis von Bazillen bei den Kontrollen früher als bei behandelten Tieren (Abb. 3). Die Ursache darf man nicht etwa darin sehen, daß die Halogen-E. die Isolierung hinderten; denn in jeder Versuchsreihe waren auch behandelte Tiere, bei denen die Bakteriämie zur gleichen Zeit wie bei den Kontrollen festgestellt

wurde. Aus den Versuchen ist weiter die Tatsache ersichtlich, daß nach der ersten Feststellung von Bazillen im Blute diese beliebig oft bei neuen Blutentnahmen gezüchtet werden konnten. Daher muß man wahrscheinlich den ersten positiven Befund als Ausdruck der nunmehr eingetretenen Sepsis und nicht etwa eines zufälligen bakteriämischen Schubes betrachten.

Ein weiteres objektives Zeichen zur Auswertung unserer Versuchsergebnisse ist der pathologisch-anatomische Befund der Tiere. Da die Milzbranderkrankung leicht feststellbare Organveränderungen macht, lohnte sich die Mühe, alle Versuchstiere zu sezieren und histologisch zu untersuchen. Das eindeutige Ergebnis dieser Arbeit war, daß makroskopisch keinerlei Unterschiede zwischen den Organbefunden der behandelten und der Kontrolltiere feststellbar waren.

Trotz der obengenannten geringen Bedeutung der pathologisch-anatomischen Befunde für die Beurteilung unserer Versuche konnten doch wertvolle Beobachtungen gemacht werden. So zeigte es sich, daß die ausgesprochenen Zeichen der Milzbranderkrankung in der Regel nur bei den Tieren zu finden waren, die wegen einer kleinen Infektionsdosis lange genug am Leben blieben. Nur dann können sich offenbar typische Organveränderungen herausbilden, da diese eine gewisse Zeit zur Entwicklung brauchen. Große Keimmengen töten die Tiere so schnell, daß nicht einmal das auffallende Oedem an der Infektionsstelle sichtbar wird.

Die Befunde waren z. B. bei einem Versuch folgende: Tiere, die bis 18 Std. nach Infektion gestorben waren, zeigten kein oder nur ganz geringes Oedem der Haut an der Infektionsstelle, gleichgültig, ob sie einer Kontrollreihe entstammten oder behandelt waren, Zwischen 18 und 30 Std. gestorbene Tiere zeigten jedoch mittleres und starkes und solche. die noch später starben, starkes bis sehr starkes Oedem.

Früher feststellbar und konstant war der Befund der Nebennierenschwellung und -blutung sowie der Milzschwellung. Hämorrhagische Meningitis, Blutungen unter Pleura und Perikard wurden nur selten gefunden.

Daß gelegentlich auch bei spät gestorbenen Tieren die typischen Zeichen fehlen und ebenso bei früh eingegangenen doch vorhanden sein können, erklärt sich durch natürliche biologische Unterschiede. Gesetzmäßigkeiten waren hierbei nie zu erkennen.

So selbstverständlich auch die obenerwähnten Befunde zu sein scheinen, so können sie doch eine Bedeutung für die Klinik und die pathologische Anatomie haben. Denn aus unseren Beobachtungen an über 400 Tieren geht einwandfrei hervor, daß bei einer großen Infektionsdosis die Milzbranderkrankung ganz akut verläuft und zum Tode führt, und daß sich daher die bekannten typischen pathologisch-anatomischen Zeichen nicht herausbilden können. Finden sich ähnliche Verhältnisse auch beim Menschen und bei Haustieren, so ergibt sich hieraus die Gefahr, daß bei einer Sektion nicht an Milzbrand gedacht und eine bakteriologische Untersuchung verabsäumt wird, weil die klassischen Befunde fehlen.

Daß ähnliche Fälle vorkommen, zeigt eine von dem Norweger Brandt beschriebene Milzbrandepidemie, die sich im Jahre 1937 nach der Schlachtung einer kranken Kuh in Norwegen ausbreitete, und bei der ein Mensch, 58 Pferde, 43 Kühe und 2 Schweine zugrunde gingen. Bei den Pferden bildeten sich an den Stichstellen große ödematöse Anschwellungen, aus denen Milzbrandbazillen aber nicht gezüchtet werden konnten. Außer einem Oedem der regionären Lymphknoten fanden sich sonst aber keine Organveränderungen. Bei den Kühen zeigte sich allerdings ein regelrechtes Krankheitsbild.

Zur weiteren Beurteilung der Versuche kann man schließlich noch das Aussehen der Tiere (struppiges Fell), ihre Reaktionsweise bei Reizen, ihre Freßlust und ähnliche allgemeine Zeichen heranziehen. Hierbei war einwandfrei zu erkennen, daß bei kleinen Infektionsdosen fast stets, bei größeren

häufig die Kontrollen eher krank erschienen als behandelte Tiere. Es kam vereinzelt auch der umgekehrte Fall vor. Bei großen Infektionsdosen waren gelegentlich überhaupt keine Unterschiede festzustellen, weil die Tiere, wie auch im Schrifttum beschrieben, meist ohne vorherige Krankheitserscheinungen starben. Diese Tatsache stellt eine Parallele zu den pathologisch-anatomischen Befunden solcher Tiere dar.

Zur Vollständigkeit unserer Untersuchungen gehörte auch der Nachweis, über welchen Mechanismus die von uns geprüften Verbindungen auf die Milzbrandbazillen einwirken, ob sie die Erreger direkt oder auf dem Umweg über das Retothel beeinflussen. Die Frage hoffte ich auf dem Wege der Blockierung des retikulo-endothelialen Systems entscheiden zu können, die durch Tuscheinjektion, Entmilzung oder Kombination beider Methoden erzielt werden kann. Diesen Verfahren haften aber leider gewisse Mängel an, die die Ergebnisse solcher Versuche unsicher machen. So ist es bekannt, daß das gleiche Mittel unter geringfügig geänderten Versuchsbedingungen einmal blockierend, ein andermal reizend auf das Retothel wirken kann. Rewo hat experimentell gezeigt, daß eine vollkommene Ausschaltung des Retothels zur Resistenzverminderung des Körpers gegenüber der Milzbranderkrankung führt, Sirena fand allerdings das Gegenteil. Diese widersprechenden Befunde sind wahrscheinlich auf die schon erwähnte Unsicherheit beim Blockierungsverfahren zurückzuführen. Wie schon erwähnt, weisen die unten besprochenen histologischen Befunde darauf hin, daß die Uferzellen des Kreislaufes für die Entstehung und den Ablauf der Milzbranderkrankung von entscheidender Bedeutung sind. Es war daher anzunehmen, daß Behandlungsversuche an Tieren, bei denen das Retothel durch Blockierung schwer geschädigt ist, mißlingen müßten. So war auch in den meisten Versuchen die Beeinflussung der Milzbrandinfektion durch Halogen-E. am blockierten Tier nicht nachzuweisen (Abb. 4). Bei anderen war eine leichte Wirkung der Halogen-E. zu erkennen, so besonders, wenn die Blockierung lange vor der Infektion vorgenommen worden war. Durch die Blockadeversuche gelang es also nicht, den Wirkungsmechanismus der Halogen-E. zu klären.

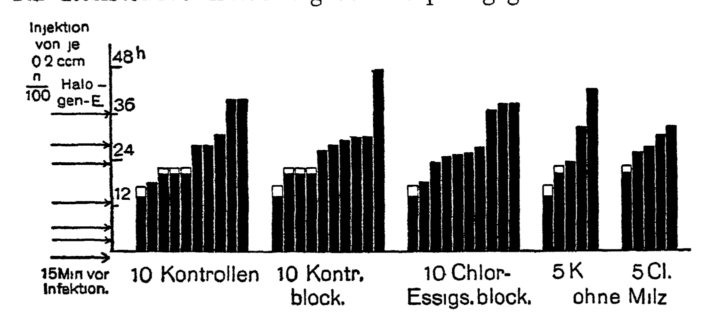


Abb. 4. Blockierung mit Tusche (0,1 ccm 1.10 intravenös injiziert) 19 Std., Entmilzung 18 Std. vor Infektion mit $^1/_2$ Oese Milzbrandagarkultur subkutan am Bauch.

Wir konnten aber auf andere Weise die Art der Beeinflussung der Milzbranderkrankung durch die Halogen-E. genauer charakterisieren. Aus allen Versuchen, bei denen wir durch Blutuntersuchungen den Eintritt der Sepsis zu ermitteln versuchten, war klar zu erkennen, daß die Halogen-E. den Eintritt der Sepsis verzögern und in einigen Fällen sogar verhindern können (Abb. 3). Es gelang aber nie, die Lebenszeit von Tieren, bei denen bereits Keime im Blut nachgewiesen waren, gegenüber der ebensolcher Kontrollen zu verlängern. Daraus ist zu folgern, daß nach dem Eintritt der Sepsis Vorgänge zum Tode führen, die durch die Halogen-E. nicht beeinflußbar sind.

Da die Halogen-E. als fermenthemmende Verbindungen bekannt sind, ist der Schluß berechtigt, daß die günstige Beeinflussung der Milzbranderkrankung, darunter auch die Verzögerung der Sepsis, durch die Hemmung der Fermente des Erregers bedingt ist. Damit ist mittelbar sehr wahrscheinlich gemacht, daß das Einbrechen der Milzbrandkeime in die Gewebe und in die Blutbahn sowie ihre dortige Vermehrung und Ansiedlung durch ihre Fermente verursacht sind.

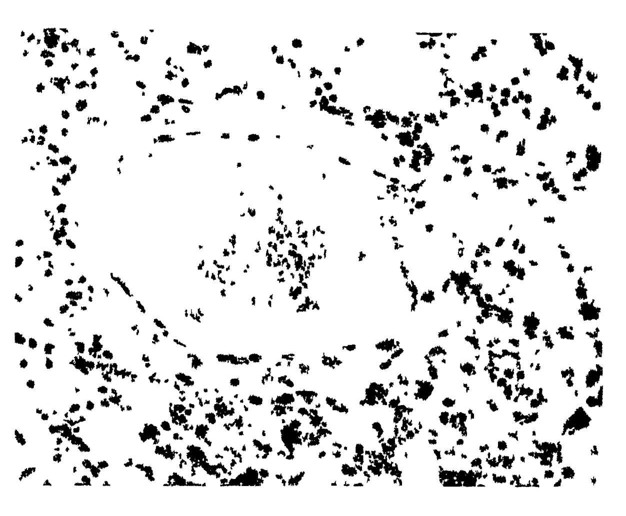


Abb. 5. Schnitt durch die Lungenvene eines unbehandelten Kontrolltieres mit Abscheidungsthrombus. Durchdringung und Einschmelzung der Wand durch die Milzbrandbazillen.

Die Bildung spezifischer Toxine durch die Milzbrandbazillen kommt, wie schon ausgeführt, nicht in Betracht. Wohl aber könnten sekundäre Toxine, sogenannte biogene Amine, eine Rolle spielen. Ihre Entstehung stellt man sich ebenfalls so vor, daß die proteolytischen Fermente des Milzbranderregers eine Zersetzung der Eiweißkörper des Wirtsorganismus hervorrufen, so daß toxische Substanzen entstehen. Auch diese Vorgänge müßten also eigentlich durch fermenthemmende Mittel beeinflußbar sein. Man kann sich aber vorstellen, daß die zugeführten Halogen-E. für die großen Massen von Erregern im septischen Körper nicht ausreichen.

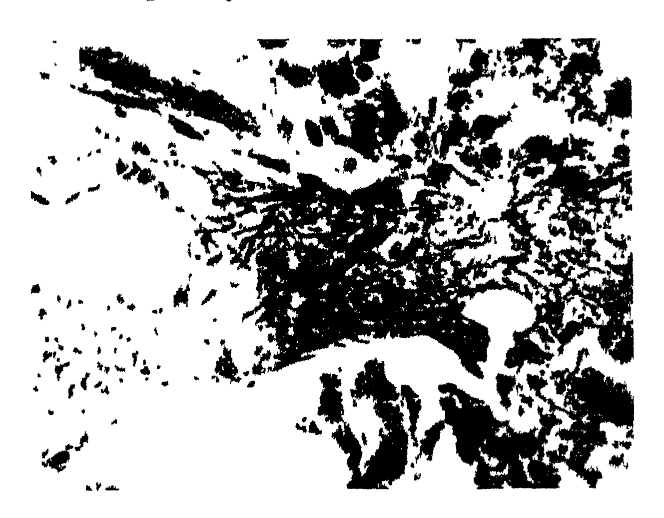


Abb. 6. Die Durchdringungsstelle der Wand bei stärkerer Vergrößerung (Oelimmersion).

Eine weitere Bestätigung für die Wirksamkeit der Erregerfermente im infizierten Tierkörper glaube ich aus meinen histologischen Befunden ablesen zu dürfen. In zahlreichen Schnittpräparaten von unbehandelten Tieren, besonders in Lungenkapillaren, kamen Abscheidungsthromben vor, die viele Bazillen enthielten. Sie waren meist wandständig; teils verschlossen sie die Gefäßlichtung völlig, teils konnte

noch ein dünner Blutstrom passieren. Auch in Leber- und Nierenvenen konnte ich solche Thromben nachweisen. Diese Neigung zur Thrombenbildung ist wahrscheinlich der Ausdruck einer elektiven Schädigung des Gefäßsystems durch den Milzbrandbazillus. Diese ist vom klinischen Erkrankungsbild her bekannt: Man denke an die schwarzrote Farbe des Milzbrandkarbunkels, an das starke Oedem und an dessen hämorrhagischen Charakter und an die Blutungen in inneren Organen. Dies sind alles Zeichen starker Beteiligung des Gefäßsystems. Die starke Gefäßschädigung ist sehr wahrscheinlich auf die proteolytischen Fermente des Milzbrandbazillus zurückzuführen. Mit ihrer Hilfe dringt er in die Uferzellen des Kreislaufes ein, schädigt dabei die Unversehrtheit der Wand und führt somit zur Thrombenbildung

An den Thromben gelang es uns auch, wie man sagen könnte, die Fermentwirkung der Bakterien histologisch sichtbar zu machen. In verschiedenen Präparaten konnte die Durchdringung und sogar die Auflösung der zelligen Bestandteile der Gefäßwand durch die Erreger aufgezeigt werden. Der bazillenhaltige Thrombus scheint sich durch die eingeschmolzene Wandstelle, ohne Organgrenzen zu beachten, in das umgebende Gewebe auszubreiten (Abb. 5 und 6). Diese Befunde zeigen eindeutig. daß der Milzbranderreger sich nicht nur auf dem Blutweg, sondern auch im Gewebe verbreitet. Man kann sie daher ebenfalls als einen Beweis für die Tatsache ansehen, daß die Verbreitung des Erregers an der Infektionsstelle und im Gewebe, sowie sein Eindringen in die Blutbahn und seine Haftung und Vermehrung in ihr, also letzten Endes die Septikämie, durch die proteolytischen Fermente des Milzbrandbazillus verursacht werden.

In der Thrombenbildung ist auch häufig die letzte Todesursache der Milzbranderkrankung zu erkennen. Wahrscheinlich durch fermentative Zersetzung der Thromben kommt es zu embolischen Prozessen in Kapillaren von Bakterienmassen, in größeren Gefäßen von Thrombenstücken herrührend. Die Bestätigung dieser Annahme ergibt sich einmal aus dem Schrifttum, in dem der Tod in vielen Fällen als akuter ohne vorherige Krankheitserscheinungen geschildert wird. Weiter ging auch bei unseren Versuchen ein großer Teil der Tiere an akuten embolischen Prozessen ein. Der andere Teil starb langsamer unter Zeichen von Kreislaufschwäche, z. B. starker zunehmender Zyanose. Diesen Kreislauftod kann man durch Versagen des rechten Herzens erklären, das den Widerstand der durch Thrombenmassen eingeengten Strombahn des kleinen Kreislaufes nicht mehr überwinden kann.

Die Thrombenbildung erklärt auch den schlechten Erfolg der intravenösen Behandlung mit Halogen-E. Sie stellt letzten Endes eine Durchspülung der Venen dar und führt zu einer plötzlichen Drucksteigerung im kleinen Kreislauf. Dadurch kommt es zum Abreißen von Thrombenstücken und zu Embolien. Bei wiederholten intravenösen Injektionen trat häufig der Tod an Embolie 1—3 Min. später ein. Luftembolie kam dabei nicht in Betracht, da darauf besonders geachtet worden war.

Zusammenfassung.

1) Es gelingt, bei milzbrandkranken weißen Mäusen durch Behandlung mit Mono-Halogenessigsäuren eine lebensverlängernde Wirkung zu erzielen, die am größten bei der Chloressigsäure ist. Bei hohen Infektionsdosen ist die Wirkung günstiger als bei niedrigen, weil bei diesen die Erkrankung chronischer verläuft und daher die toxischen Einflüsse der Halogenessigsäuren infolge der langdauernden Behandlung eher in Erscheinung treten.

2) Die lebensverlängernde Wirkung beruht hauptsächlich auf einer sicher nachweisbaren Hinauszögerung des Eintrittes der Septikämie.

3) Da die Halogenessigsäuren Verbindungen sind, die die proteolytischen Fermente hemmen, ist die günstige Beeinflussung der Erkrankung und die Hinauszögerung der Septikämie mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine Hemmung der Fermente der Milzbrandbazillen zurückzuführen. Man darf somit annehmen, daß die Vermehrung des Keimes an der Infektionsstelle sowie das Eindringen in die Blutbahn und in die Gewebe durch seine Fermente verursacht wird.

4) Aus den histologischen Untersuchungen geht hervor, daß der Milzbranderreger — vermutlich primär — eine Schädigung der Gefäße verursacht, die ihren Ausdruck in stellenweiser Einschmelzung der Gefäßwände und in Thrombenbildung findet. Diese Prozesse sind wahrscheinlich ebenfalls auf die Wirkung der starken proteolytischen Fermente des Keimes zurückzuführen.

5) Die Thrombenbildung erklärt den Tod einer großen Zahl von Fällen durch embolische Prozesse oder durch Versagen des rechten Herzens wegen Einengung der Strombahn des kleinen Kreislaufes. Andererseits entstehen bei der Einschmelzung der Gefäßwand und des übrigen Gewebes wahrscheinlich biogene Amine, die auf den Körper toxisch wirken.

Schrifttum.

Boquet, C. r. Soc. Biol. **99**, 1772 (1928) u. **107**, 768 (1931). — Brandt, Norsk. Vet.-Tidsskr. Nr 1, 1 (1938). — Brieger u. Fraenkel, C., Berl. klin. Wschr. **1890**. — Gins, Kroemer, Link, Zbl. Bakter. I Orig. **142**, 225 (1938). — Hankin, Brit. med. J. **1889** u. **1890**. — Hoffa, Langenbecks Archiv **39** (1889). — Koch, R., zit. nach Handb. d. pathog. Mikroorg. III, 2, 1092. — Pernice u. Scagliosi, Dtsch. med. Wschr. **1892**. — Rewo, Ref. Bull. Pasteur **1928**. — Singer, Z. Immun.forschg **43** u. **45** (1925); **49** (1926). — Sirena, Rif. med. **1892**. — Uchida, Z. Hyg. **106**, 96, 275 (1926). — Wohlfeil, Zbl. Bakter. I Ref. **125** (1937); Klin. Wschr. **1937**, 1369. — Wohlfeil u. Wollenberg, Zbl. Bakter. I Orig. **141**, 159 (1938).

[Aus dem Pr. Hygienischen Institut (Direktor: Prof. Dr. R. Hilgermann), hygienisch-bakteriologische Abteilung (Vorsteher: Prof. Dr. H. Großmann) Landsberg (Warthe).]

Untersuchungen über Abgrenzbarkeit, Vorkommen und Veränderlichkeit der Diphtheriebazillentypen.

Von Prof. Dr. **H. Großmann.**

Die Vereinfachung der Diphtheriediagnose ist in den letzten Jahren durch Einführung und Verbreitung der bekannten Nährböden nach Clauberg erheblich gefördert worden. Nach der Auffassung der überwiegenden Mehrzahl der Autoren ist ein Fortschritt vor allem darin zu erblicken, daß nunmehr die Möglichkeit besteht, ohne Einbuße an Sicherheit der Diagnose gegenüber anderen Verfahren eine große Anzahl von Abstrichen in kurzer Zeit zu verarbeiten. Uebereinstimmung dürfte darin bestehen, daß die Zahl der

mit diesen Nährböden zu erfassenden positiven Befunde hinter der mit dem bisher fast ausschließlich verwandten Loeffler-Nährboden erzielten keinesfalls zurückbleibt. Dieser Fortschritt kommt ferner der in letzter Zeit auch hinsichtlich der Diphtheriebakterien mehr und mehr in den Vordergrund tretenden Typenfrage zugute. Wie bei anderen Krankheitserregern, so handelt es sich auch hier nicht um ein rein bakteriologisch-systematisches Interesse, sondern um eine Notwendigkeit in pathogenetischer, therapeutischer und epidemiologischer Beziehung. Zwar ist der Wert dieser Arbeitsrichtung noch nicht voll erkannt und anerkannt, doch kann dies nicht dazu veranlassen, auf den weiteren Ausbau der Typenfrage zu verzichten und damit spätere Möglichkeiten außer acht zu lassen. Dabei muß allerdings eine vorzeitige Ueberschätzung der Bedeutung der Typen vermieden werden. Wenn solche Bestrebungen stets zugleich mit der Frage der Variabilität eng verbunden werden, so kann dies nur zur Klärung des gesamten Problems beitragen.

I.

In der Zeit vom 29. 11. 38 bis 27. 4. 1939 wurden auf der hygienisch-bakteriologischen Abteilung des Instituts 594 positive Diphtheriebefunde erhoben. Sie verteilen sich auf 260 Krankheitsfälle und 17 Fälle von Bazillenträgern, die gelegentlich von Umgebungsuntersuchungen und von Durchuntersuchungen zum Zweck der Kurverschickung erfaßt wurden.

Seit 2—3 Jahren ist hier für die tägliche Diphtheriediagnose der Clauberg III-(Indikator-) Nährboden in Gebrauch, und wir glauben, damit auch in letzter Zeit gute Erfahrungen gemacht zu haben. Die diesem Verfahren noch anhaftenden Nachteile werden durch seine Vorteile sicher weit überwogen. Bei entsprechender Uebung halten wir es auch für möglich, die Diagnose in den weitaus meisten Fällen makroskopisch so sicher zustellen, daß auch der Irrtum einer Verwechselung der hyperaziden Pseudodiphtherie mit echter Diphtherie vermieden wird. Wir schließen das wohl mit Recht aus folgendem Ergebnis: unter 392 positiven Platten waren nur 64 makroskopisch als zweifelhaft bezeichnet worden, d. h. in 16,3 Proz. der Fälle mußte die Diagnose mikroskopisch bzw. auch kulturell sichergestellt werden. Unter den schon makroskopisch als positiv angesprochenen Fällen hatte sich aber, wie die sich anschließende mikroskopische und später zum Zweck der Typbestimmung weitere kulturelle Untersuchung ergab, kein Stamm gefunden, der sich nachträglich als hyperazide Pseudodiphtherie herausgestellt hätte, auch ist uns dabei keine Fehldiagnose durch blauwachsende fremde Keime (Streptokokken) unterlaufen. Die 11 während der Untersuchungsperiode festgestellten hyperaziden Pseudodiphtheriestämme entfielen alle auf Platten, die makroskopisch als zweifelhaft angesprochen worden waren.

Weniger sicher dürfte sich allerdings der Nachweis von hypaziden Stämmen gestalten. Schlirf berichtete kürzlich von dem Vorkommen hypazider Stämme gravisähnlichen Charakters, die bei Anwendung des Clauberg-III-Nährbodens der Feststellung entgehen, da sie infolge fehlender Dextrosespaltung die Farbe des Nährbodens überhaupt nicht verändern. Auch Hohn (3) weist auf die Schwierigkeit der Erfassung solcher Stämme hin. Wir haben uns bis jetzt vergeblich bemüht, solche ausfindig zu machen, dagegen isolierten wir bei einem Krankheitsfall aus demselben Abstrich 2 Stämme, die auf der III-Platte durch sehr geringe bzw. fast fehlende Farbveränderung auffielen. Außerdem entsprach der braungrüne Mischfarbton durchaus nicht der bei echter Diphtherie allermeist vorliegenden Farbveränderung. Beide Stämme erwiesen sich als echte Diphtheriestämme. Die eingehendere Prüfung 1½ Monate nach Isolierung ergab bei ausgesprochener Stärke-Glykogen-Maltose-Zersetzung stark verzögerte Dextrosespaltung. Säurebildung war erst nach 48 Std. deutlich zu erkennen. Bei nochmaliger Ueberimpfung auf Clauberg III trat jetzt nach 24 Std. eine Farbveränderung überhaupt nicht auf, erst nach 48 Std. zeigten sich deutliche Höfe von mehr grüner als blauer Farbe. Beide Stämme gehörten einwandfrei dem Typ Gravis an. Zweifellos ist in einem solchen Verhalten ein Nachteil des Clauberg-III-Nährbodens zu erblicken. Nach unseren bisherigen Erfahrungen dürfte es sich dabei aber nur um ein seltenes Versagen handeln, und es würde dies wohl nichts gegen die Brauchbarkeit des Nährbodens bedeuten.

Die Entschiedenheit, mit der Schlirf den Clauberg-III-Nährboden gegenüber Clauberg II kürzlich als ungenügend abgelehnt hat, hat uns ebenfalls sehr überrascht [vgl. Hohn (3)]. Wir sahen uns daher auch zu vergleichenden

Untersuchungen zwischen Clauberg II und III veranlaßt, was die Ausbeute an positiven Fällen betrifft[1]). Herrmann schlägt ganz neuerdings einen verbesserten Clauberg III-Nährboden vor, der nach seinen Feststellungen die Ausbeute an positiven Resultaten bedeutend erhöhen und zugleich den Vorteil der fast ausschließlichen makroskopischen Beurteilung haben soll. Dieser Nährboden konnte bei diesen unseren Untersuchungen noch keine Berücksichtigung finden.

Die Abgrenzung der Typen beruht bekanntlich auf Unterschieden im Wachstum auf festen, weniger flüssigen Nährböden und im biochemischen Verhalten. Hohn (3, 4) hat kürzlich zur Frage der Methodik der Typenbestimmung Stellung genommen und betrachtet als das allein entscheidende Kennzeichen das Verhalten gegenüber Stärke-Dextrose-Saccharose. Als optimales Nährmedium wird die Hottinger-Bouillon mit Zusatz von Neutralrot oder, noch besser, von Wasserblau als Indikator angesehen. Dagegen empfiehlt Clauberg (5) neuerdings einen festen Nährboden, der nach seinen Angaben die Typabgrenzung „mit Leichtigkeit in überzeugender Weise" ermöglicht. Schlirf hält die Säuretitrierung für die sicherste Methode. Man könnte daraus schließen, daß der Typenbestimmung noch erhebliche Unsicherheiten anhaften.

Im Interesse einer beschleunigten Diagnose wäre es natürlich erwünscht, unter Verzicht auf die Kohlehydratreihe mit einem festen Nährboden auszukommen, da die Verwendung flüssiger Nährböden wegen der Sicherstellung einer Reinkultur mit einer Verzögerung der Diagnose verbunden sein muß. Dieser Gesichtspunkt war offenbar auch für Clauberg bei der Ausarbeitung eines neuen Plattenverfahrens mitbestimmend.

Für unsere eigenen Untersuchungen bedienten wir uns der Bluttellurplatte nach Gundel-Tietz, der neuen Kartoffelwasserglyzerinagarplatte mit Zystin und Wasserblau nach Clauberg und der Prüfung des Verhaltens gegenüber Stärke (Dextrose u. Saccharose). Auf dem Claubergschen Nährboden (hier kurz bezeichnet als Wasserblau- = W.Bl.-Platte) soll der Typ Gravis in außerordentlich großen, flachen, rauh-trockenen Kolonien von blauer Farbe wachsen, der Typ Mitis dicklich, schleimig, feucht glänzend, grau-weißlich, vereinzelt leicht bläulich, Typ Intermedius sehr zart und farblos. Für die Kohlehydratreihe benutzten wir 1proz. Peptonwasser mit Zusatz von 0,5 Proz. NaCl, von 2—3 Proz. Aszitesflüssigkeit und von 5 Proz. Lackmus, das Kohlehydrat zu 1 Proz. Außerdem wurde die Hämolyse auf der Rinderblutagarplatte geprüft. Im Laufe der Untersuchungen hat es sich zur Erzielung besseren Wachstums und einer festeren Konsistenz des Nährbodens als zweckmäßig erwiesen, die W.Bl.-Platte dahin abzuändern, daß wir 4proz. Agar und einen Zusatz von 1 Teil Aszitesflüssigkeit auf 3 Teile Agar verwandten. Im übrigen hielten wir uns genau an die dort gegebenen Vorschriften. Die W.Bl.-Platte wurde stets von der Indikatorplatte aus beimpft, nur bei sehr reichlicher Mischkeimflora mußte eine Abimpfung auf Blutagar vorausgehen.

Der Hauptwert wurde zunächst auf die vergleichende Prüfung der Bluttellur- und der W.Bl.-Platte gelegt. Es ergab sich sehr bald die eindeutige Ueberlegenheit der letzteren. Der charakteristische Wachstumsunterschied auf diesem Nährboden ermöglicht die Abgrenzung der bekannten 3 Typen mit größerer Sicherheit, die Bluttellurplatte wurde daher bald ganz aufgegeben. Wir wollen aber damit nun nicht sagen, daß uns in 100 Proz. der Fälle die Typabgrenzung etwa mit Leichtigkeit, sozusagen „auf den ersten Blick" gelungen wäre, Schwierigkeiten bereitete auch hier manchmal die Abgrenzung von Gravis und Mitis. Wenn das Koloniebild auch nicht regelmäßig völlig dem von Clauberg als charakteristisch bezeichneten Wachstum entspricht, so war weitaus in der Mehrzahl der Fälle die Einreihung unter einen der 3 Typen doch bedenkenlos möglich. Solche geringen Schwankungen im Aussehen der Kolonien (Breite, Größe, Höhe, Ueppigkeit, mehr rauh oder mehr glänzend, Unterschiede in der Bläuung) scheinen durch die

1) Erscheint in „Med. Klinik".

jeweilige Beschaffenheit des Nährbodens (Aszitesflüssigkeit) bedingt zu sein, man ist nicht gezwungen, darin gleich eine Variation innerhalb des Typs zu erblicken. Nur zu oft sahen wir, daß bei einem neuen Plattensatz solche Abweichungen ausblieben. Unter den 594 geprüften Stämmen fanden sich aber auch einige wenige, bei denen die Entscheidung, ob Gravis oder Mitis, nicht zu treffen war. Dann schien es, als ob die Stämme eine Mittelstellung zwischen Gravis und Mitis einnehmen. Manchmal genugte auch hier eine weitere Passage zur Behebung dieses Zweifels, gelegentlich konnte das Wachstum auf Bluttellur die Frage entscheiden. In anderen Fällen aber mußte die Diagnose offen bleiben. Die Intermediusstämme konnten stets ohne Schwierigkeiten abgegrenzt werden, wenngleich auch hier das Wachstum nicht immer als „sehr zart" zu bezeichnen war.

Wenn wir das gesamte Material nach dem Vorkommen solcher nicht einzureihender, zweifelhafter Falle sichten, so kommen wir auf 5 Stämme. Dieser Ausfall ist als sehr minimal anzusehen. Wir glauben daher in Bestätigung der Angaben von Clauberg sagen zu können, daß die W.Bl.-Platte einer schnellen und sicheren Typdiagnose gerecht wird. Diese Annahme wird gestützt durch vergleichende Heranziehung der Kohlehydratreihe. An 91 Stämmen wurde das Ergebnis der Plattendiagnose durch die biochemische Prüfung nachträglich kontrolliert. Mit Ausnahme der erwähnten 5 Fälle ergab sich Uebereinstimmung insofern, als die Stärkeröhrchen durch Gravis rasch gerötet wurden, durch Mitis dagegen nicht, wobei zu betonen ist, daß auch bei mehrtägiger Beobachtung ein deutlicher Farbumschlag nicht eintrat. Eine geringfügige Farbänderung konnte ebensogut auf den Abbau der Aszitesflussigkeit zurückgeführt werden. Die fünf zweifelhaften Fälle verhielten sich aber auch gegenüber Stärke nicht eindeutig positiv im Sinn von Gravis oder Mitis. Bei wiederholter Prüfung zersetzten sie die Stärke langsam bis zu völliger Rötung nach 3 Tagen. Dieses Verhalten entspricht weder dem von uns sonst bei Gravis noch bei Mitis bis jetzt festgestellten. Schlirf ist der Meinung, daß unter den Typen nicht qualitative, sondern nur quantitative Unterschiede bestehen, was die Fähigkeit der Säurebildung aus Stärke betrifft, derart, daß sowohl Gravis wie Mitis nach mehreren Tagen die Stärke angreifen, Mitis aber viel weniger als Gravis. Danach könnten die Stämme dennoch zum Typ Mitis gehören, da wir bei Gravis stets schon nach 24 Std. starke Säuerung der Stärkeröhrchen beobachteten. Es ist auch daran zu denken, daß vielleicht eine Unregelmäßigkeit in der Herstellung des Nährsubstrates vorlag. Eine solche Ursache festzustellen, ist uns aber bis jetzt nicht gelungen. Wir möchten die Diagnose bei diesen Stämmen offen lassen und bezeichnen sie als zweifelhaft.

Man muß also zugeben, daß auch bei dem neuen von Clauberg angegebenen, von uns etwas abgeänderten Nährboden gelegentlich Unsicherheiten in der Erfassung des Koloniebildes festzustellen waren. Ob dies stets auf einer Labilität gegenüber kulturellen Einflüssen beruht, oder ob darin auch eine Variabilität innerhalb des Typs zum Ausdruck kommen kann, bleibe vorläufig dahingestellt. Keinesfalls können wir aber sagen, daß wir, wie Hohn (4), eine „erstaunliche Anzahl von Differenzen" in Koloniebild und Vergärung beobachtet hätten. Hohn hat allerdings nicht mit der neuen Claubergschen Differenzierungsplatte gearbeitet. Es ist uns z. B. bis jetzt kein Fall begegnet, der nach der Platte sicher als Mitis diagnostiziert worden wäre, während er biochemisch einwandfrei einem Gravis entsprach, oder umgekehrt. Wir glauben daher, die Auffassung vertreten zu können, daß sich die Typdiagnose im allgemeinen durchaus mit Recht auf der Wuchsform aufbaut. Es ist aber wohl denkbar, daß in be-

sonderen Fällen auf die Entscheidung durch den Kohlehydratversuch nicht zu verzichten ist.

II.

Die Gesamtzahl der positiven Befunde teilt sich nach Typzugehörigkeit, wie folgt, auf:

Typ Gravis	469
Typ Intermedius . .	45
Typ Mitis	80
Insgesamt	594

Diese Stämme wurden gezüchtet bei 260 Erkrankten und 17 Bazillenträgern. Betrachtet man das Ergebnis der ersten Untersuchung als hierfür maßgebend, so waren verursacht durch

Gravisinfektion	199 = 76,5 Proz.
Intermediusinfektion	28 = 10,7 ,,
Mitisinfektion	28 = 10,7 ,,

der Krankheitsfälle, in 1,1 Proz. war der Erregertyp zweifelhaft, 2mal lag eine Mischinfektion von Gravis und Intermedius vor. Auf die Bazillenträger kamen 16mal der Gravis- und 1mal der Intermediusnachweis.

Ergänzend sei der 11 Befunde von hyperazider Pseudodiphtherie Erwähnung getan: 6mal bei Erkrankungen, 5mal bei Umgebungsuntersuchungen.

Es überwiegt demnach weit der Typ Gravis, Typ Intermedius und Mitis entsprechen sich in der Häufigkeit zufällig genau mit weit weniger als der Hälfte des Gravisvorkommens, der Rest von 2,1 Proz. fällt auf Mischinfektionen und zweifelhafte Diagnosen. Diese Verteilung, die erstmals für den Regierungsbezirk Frankfurt/Oder rechts der Oder und die Grenzmark Posen-Westpreußen nachgewiesen ist, entspricht, was das Ueberwiegen des Typ Gravis betrifft, im wesentlichen den auch in anderen Gegenden Deutschlands festgestellten Verhältnissen, eine auffallende Aehnlichkeit besteht mit der von Preuner (6) für Ostpreußen im Sommer 1935 ermittelten Typverteilung (77,9 Proz. Gravis, 13,9 Proz. Intermedius, 4,7 Proz. Mitis).

Unter den Erkrankungsfällen finden sich 56, bei denen 3—14mal positive Befunde erhoben wurden. Wenn man diese Fälle bezüglich der Frage des Typwechsels im Laufe der Erkrankung untersucht, so ergibt sich folgendes:

Nur 4mal war ein Typwechsel festzustellen, und zwar 1mal von Intermedius zu Mitis, 2mal von Mitis zu Gravis und 1mal von Gravis zu Mitis. Bei 3 dieser Fälle (unter 39) handelt es sich um Krankenhauspatienten, 1mal (unter 13) um einen zuhauseliegenden Patienten. 4 Kranke zeigten nach der Verlegung ins Krankenhaus wiederholt denselben Typ wie vorher zuhause.

Von den 17 Bazillenträgern sind 4 3—5mal untersucht worden, bei 2 war ein Wechsel von Gravis zu Mitis festzustellen.

Von verschiedenen Autoren ist ein Typwechsel mehr oder weniger häufig beobachtet worden, er soll besonders oft mit einem Ortswechsel im Zusammenhang stehen, so auch mit dem Uebergang vom Heim ins Krankenhaus (Preuner, Pesch u. a.). Man hat auch versucht, daraus zu schließen, daß die Typen ineinander übergehen können, ihre Konstanz demnach recht fraglich sei. An unserem Material konnten wir einen solchen Wechsel nur selten feststellen, auch keine Zusammenhänge mit Krankenhausaufenthalt und Heimpflege. Im Verhältnis war der Wechsel im Typennachweis im Laufe der Erkrankungen in beiden Fällen gleich. Wenn auch die Möglichkeit des gelegentlichen Uebergangs der Typen auch unter natürlichen Verhältnissen nicht von vornherein bestritten werden kann, so dürfte es doch nicht angängig sein, solche Feststellungen im Sinne einer Umwandlung in vivo zu deuten.

In erster Linie muß jedenfalls daran gedacht werden, daß man es dabei mit Doppelinfektionen zu tun hat, wobei einmal dieser, das andere Mal jener Typ überwiegt. Ebensowenig können spätere Superinfektionen bei zunächst einheitlicher Infektion ausgeschlossen werden. Die Sichtung unseres Materials ergibt, daß in 11 Fällen, die 6—14mal einen positiven Befund hatten, 3mal nur Mitis (14mal, 8mal, 7mal, untersucht), 6mal nur Gravis (12mal, 10mal, 7mal, 6mal untersucht), 1mal nur Intermedius (6mal untersucht) nachgewiesen wurde. Nur bei einem Mitisfall war der 7. Befund zweifelhaft. Diese Tatsache spricht an sich schon für die Konstanz der Typen, außerdem zugleich auch für die große Sicherheit der hier angewandten Typbestimmung, die stets unabhängig von den vorausgegangenen Befunden erfolgte. Die drei von uns festgestellten Doppelinfektionen betreffen einen Krankenhausfall und zwei Heimfälle. Beim ersten lautete der Befund Gravis, einen Tag später Gravis + Intermedius, bei den beiden anderen nur einmal untersuchten Gravis + Intermedius. Es ist auffallend, daß 3mal die Kombination Gravis + Intermedius vorliegt und der Typ Mitis ganz ausfällt, obwohl er im ganzen ebenso häufig wie Intermedius vorgekommen ist. Nun muß man bedenken, daß neben Gravis Intermedius immer leichter festzustellen ist als Mitis, da er auf der Blutplatte durch die fehlende Hämolyse leicht auffällt. Dieses Merkmal versagt jedoch zur Unterscheidung von Gravis und Mitis. Wenn man daher nicht eine größere Anzahl von Kolonien getrennt untersucht, wird eine Doppelinfektion Gravis-Mitis leicht entgehen. Man muß daher auch die Frage berücksichtigen, ob nicht Doppelinfektionen dieser Art überhaupt von vornherein häufiger vorkommen. Das Ueberwiegen des einen oder anderen Typs im Laufe der Erkrankung könnte dann als spätere Superinfektion imponieren, die in Wirklichkeit nicht immer vorliegt. Keinesfalls aber können solche Beobachtungen im Sinne einer Typumwandlung in vivo ausgelegt werden.

Zu erwähnen sind in diesem Zusammenhang noch die 11 Befunde von hyperazider Pseudodiphtherie. Ihre Feststellung ist keinen besonderen Schwierigkeiten begegnet (siehe unter I). Auf der W.B.-Platte unterscheidet sich das dickschleimige weißliche Wachstum unter regelmäßig starker Aufhellung des blauen Nährbodens so eindeutig von den 3 Typen, daß auch hier eine Abgrenzung leicht möglich ist. Die Befunde betreffen 5 Krankheitsfälle und 5 Umgebungsuntersuchungen: 3 Rachenabstriche, 1 Abstrich bei Wunddiphtherie, 1 Ohrabstrich bei gleichzeitiger Rachen- und Nasendiphtherie, 6 Nasenabstriche. Bei einem Krankheitsfall wurde bei der ersten Untersuchung ein hyperazider Stamm nachgewiesen, die weiteren Befunde lauteten stets Gravis.

III.

Bald nach Bekanntwerden der englischen Arbeiten sind Versuche über die Veränderlichkeit der Typen angestellt worden (s. Christison, Schlossberger). Diese ergaben, daß sowohl das Wachstum auf flüssigen und festen Nährböden wie auch das Hämolysevermögen variabel sind.

So beschreibt z. B. Christison den Uebergang der rauhen Kolonieform des Gravis in eine glatte mitisähnliche Form und umgekehrt. Nach Hammerschmidt, der Wachstumsstudien auf „Hungeragar" durchgeführt hat, soll die Veränderlichkeit der Typen darauf beruhen, daß es sich nicht um einheitlich zusammengesetzte Stämme handelt, sondern daß allen Typen eine Grundform eigen ist, der C-Intermediustyp, dem sich 2 Glattformen als Gravis- und Mitistyp anlagern können, die bei Weiterzüchtung sich von der C-Form wieder abspalten können. Danach würde die Variabilität auf den jeweils mehr oder weniger stark vertretenen A- und B-Bestandteilen beruhen. Das würde dann auch die Möglichkeit des Uebergangs von einem Typ in den anderen erklären, wenn auch ein Uebergang, wie Hammerschmidt sagt, unter normalen Lebensverhältnissen nicht zu erfolgen scheint. Clauberg, Helmreich und Vierthaler kamen in eigens diese Fragen betreffenden Untersuchungen

zu der Annahme, daß die Beobachtung von Hammerschmidt auf einer Verwechselung zwischen Wuchsvarianten und Kolonietyp beruhe, somit nichts gegen Konstanz und Abgrenzbarkeit der Typen besage. Die Autoien sahen bei Zuchtung auf Agar die Abspaltung von 3 verschiedenen Variantenarten, die bei allen 3 Typen in gleicher Weise auftraten und gewisse Aehnlichkeiten mit den 3 typischen Koloniebildern aufwiesen. Jede der 3 Wuchsformen konnte für sich die 3 Arten wieder erneut abspalten. Bei Rückimpfung auf optimale Nahrboden trat bei allen 3 Wuchsformen wieder der Ausgangstyp in Erscheinung, auch waren Unterschiede im biochemischen Verhalten nicht festzustellen. Preuner (7) beschreibt den Uebergang von Intermedius nach Gravis auf dem Weg über die hyperazide Pseudodiphtherie nach Behandlung der Brühekulturen mit Kupfersulfat, erachtet aber selbst diese Ergebnisse nicht als beweisend für eine Umwandlung. Pesch sah in alternden Brühekulturen bei 6 Intermediusstämmen eine vollständige Umwandlung zum Typ Mitis.

Wenn auch die Möglichkeit einer experimentellen Ueberführung von Typ zu Typ noch lange nichts gegen Abgrenzbarkeit und praktische Bedeutung der Typen beweisen würde, so ist diese Frage, abgesehen von der rein theoretischen Seite, doch deswegen von erheblichem Interesse, weil bejahendenfalls nähere Einblicke gewonnen werden könnten in Vorgänge, die sich möglicherweise auch unter natürlichen pathogenetischen und epidemiologischen Bedingungen vollziehen. Denn es wäre wohl nicht angängig, das, was auf künstlichem Wege darstellbar ist, als in der Natur gänzlich unmöglich abzulehnen, selbst wenn die epidemiologische Erfahrung keine sicheren Anhaltspunkte für ein solches Geschehen zu bieten scheint. Außerdem haben solche Untersuchungen auch sehr nahe Beziehungen zu der neuerdings viel besprochenen Frage der experimentellen Abwandlung von Diphtheriebazillen zu Pseudodiphtheriebazillen (Dold, Weigmann, Waldhecker u. a.).

Im Rahmen von Versuchen über die Vermehrungsfähigkeit von Bakterien in sterilisiertem Abwasser wurde auch die Veränderlichkeit unter dem Einfluß eines solchen Milieus mit Heranziehung der Diphtheriebazillentypen berücksichtigt.

Frische Brühekulturen wurden in vorgeklärtes Abwasser (ca. 10 ccm) aus der städtischen Kanalisation, nachdem dieses 1—2 Std. bei 120° autoklaviert worden war, tropfenweise eingebracht und bei 37° C gehalten. An Stämmen wurden verwandt 6 Einkeimkulturen, und zwar je 2 aus einem Gravis-, Intermedius- und Mitisstamm. Die Stämme waren uns seinerzeit von Dozent Dr. Preuner-Göttingen als Teststämme überlassen worden, die Einkeimkulturen wurden von Dr. Vierthaler-Berlin hergestellt. Beiden Herren sei auch an dieser Stelle bestens gedankt. Außerdem wurde noch ein hier gezüchteter Gravisstamm herangezogen. Das Abwasser wurde teils in unverändertem, teils in mit Tierkohle geklärtem Zustand beimpft. Geklärtes Abwasser erwies sich, wohl wegen zu geringen Gehaltes an Nährstoffen, als weniger geeignet. Die pH war natürlicherweise 7,6—8,0.

Nach 6 Tagen waren bei Abimpfung auf die W.Bl.-Platte nach Clauberg bei Gravis 1 und 2 (= Gr. 1 und 2) 2 deutlich unterscheidbare Wuchsformen festzustellen, und zwar neben der normalen Typform (groß-breit-rauh-gezackt, wie sie auch aus den gleichzeitig angesetzten Brühekontrollen wuchs) runde, gewolbte und matt glänzende Kolonien. Mitis (M. 1 und 2) und Intermedius (I. 1 und 2) zeigten keinerlei Veränderungen. Die Rundformen von Gr. 1 hatten gegenüber den Gezacktformen die Fähigkeit der Auflösung von Rinderblutkörperchen (auf Agar) gänzlich verloren, die von Gr. 2 fast völlig. Die nochmalige Abimpfung von Gr. 1 und 2 nach weiteren 8 Tagen ergab im wesentlichen die gleichen Kolonien, bei Gr. 2 jedoch nur die runde Form. Die Brühekontrollen gingen um diese Zeit nicht mehr an. Von M. und I. 1 und 2 zeigten nach dieser Zeit aus Abwasser nur noch I. 1 Wachstum ohne Varianten, die anderen Stämme gingen nur noch aus den Kontrollen an, ohne eindeutige Veränderung des Koloniebildes gegenüber den auf Loeffler-Serum weitergezüchteten Originalstämmen. Die Aussaat nach im ganzen 20 Tagen ergab das gleiche Bild.

Die Rund- und Gezacktformen von Gr. 1 wurden auf eine neue Abwasserprobe gebracht. Bei Abimpfung nach 2 Tagen auf W.Bl.-Agar spalteten die Gezacktformen wiederum Rundformen ab, die Rundformen dagegen zeigten keine weiteren Veränderungen, sondern blieben konstant. Die Gezacktformen sowohl aus Abwasser wie aus den Kontrollen hatten nun den für sie ursprünglich charakteristischen unregelmäßigen Rand verloren, waren aber im übrigen von dem bekannten Gravisaussehen.

Die Wiederholung des Versuches mit den Gravis-Originaleinkeimkulturen führte zu dem gleichen Ergebnis, nur war der Stamm Gr. 2 diesmal wesentlich weniger variationsbereit.

Die nachstehende Tabelle gibt eine Uebersicht über das kulturelle und biochemische Verhalten von Gezackt- und Rundformen und Brühekontrolle des Originalstammes Gravis 1.

Tabelle I.

Stämme	„Wasser-blau"-agar	Clauberg III	Loeffler, mikro-skopisch	Brühe			S	M	D	St	Gl	Hämo-lyse R.Bl.A.
				T	B	H						
„ge-zackt" I	rauh, matt, breit, flach	typisch blau	schwach gelb, typisch	±	+	±	0	+	+	+	+	±
„rund" I	üppig-schleimig, konfl., glänzend	dgl.	schwach gelb, diphthe-roid?	++	(±)	±	0	+	+	+	+	0
„ge-zackt" II	wie I	dgl.	schwach gelb, Pseudo-diphthe-rie?	±	+	±	0	+	+	+	+	++
„rund" II	wie I	dgl.	schwach gelb, di-phtherie-ähnlich	++	(±)	±	0	+	+	+	+	0
Brühe-kontrolle	rauh, matt, breit-flach	dgl.	schwach gelb, typisch	±	+	±	0	+	+	+	+	+

Es bedeutet: I = aus Abwasserprobe I, II = aus Abwasserprobe II nach Passieren von Probe I, „Wasserblau"agar = Typdifferenzierungsnahrboden nach Clauberg, s. Text. T = Trübung, B = Bodensatz, H = Hautchen, S = Saccharose, M = Maltose, D = Dextrose, St = Stärke, Gl = Glykogen, R.Bl.A. = Rinderblutagar.

Hierzu sei folgendes bemerkt:

Das Wachstum der Rundformen auf W.Bl.-Agar war nicht etwa nur mitisähnlich, sondern entsprach vollkommen dem typischen Mitisbild, so daß man die Stämme ohne Kenntnis ihrer Herkunft und bei alleiniger Anwendung der W.Bl.-Platte als sicheren Mitis bestimmt hätte. Die Rundformen ließen jede Aufhellung in der Umgebung der Kolonien auch nach mehreren Tagen der Bebrütung auf der Rinderblutplatte vermissen, bei gezackt I, das sich in dieser Hinsicht von gezackt II stark unterschied, blieb die Aufhellung auch nach längerer Zeit sehr geringfügig. Das gelbliche Wachstum auf Loeffler-Serum war durchweg typisch, gezackt II wuchs aber auffallend schwach gegenüber den anderen Stämmen. Der Grad der morphologischen Abwandlung entsprach nicht der Wuchsform und der Dauer der Einwirkung von Abwasser: Trotz längeren Aufenthaltes im Abwasser waren bei rund II die Stäbchen mehr diphtherieähnlich als bei rund I. Die stärkste Abwandlung zeigten nicht etwa die Rundformen, sondern gezackt II mit ganz kurzen Stäbchen, die in der Lagerung Neigung zur Regelmäßigkeit und kaum die Bildung von Polkörperchen aufwiesen. Die Stäbchen erinnerten sehr stark an Pesudodiphtherie. Auf einfacher Brühe war das Wachstum von rund I und II durch starke Trübung gegenüber den anderen Kulturen gekennzeichnet, während bei letzteren die Bildung eines Bodensatzes im Vordergrunde stand. In biochemischer Beziehung konnte gar kein Unterschied festgestellt werden.

Die hier geschilderten Veränderungen konnten an einem weiteren Gravisstamm ohne wesentliche Abweichungen auf die gleiche Weise erzielt werden.

Es ist somit gelungen, sichere Graviskeime so weit zu variieren, daß sie im Koloniebild auf einem festen Differentialnährboden völlig dem Typ Mitis entsprachen, in dem auf flüssigen Nährböden ihm mindestens sehr ähnlich war. Diesem Verhalten entsprach aber nicht eine analoge Aenderung in der biochemischen Leistung: die Fähigkeit zur Stärke- und Glykogenspaltung blieb erhalten. Das ursprünglich vorhandene Hämolysevermögen von Rinderblutkörperchen ging dabei verloren, ebenso das typische morphologische Bild. Je 2 Mitis- und Intermediuskulturen reagierten bei gleicher Behandlung nicht mit der Ausbildung von Varianten, die eine weitere Entfernung vom Typus hätten erkennen lassen. Die erwähnten Varianten traten schon kurze Zeit nach Einwirkung von Abwasser auf und blieben auf optimalen Nährböden bis jetzt über mehrere Monate in ihren wesentlichen Eigenschaften konstant. Es dürfte sich demnach um eine tiefer gehende Wandlung recht stabilen Charakters handeln, daher wahrscheinlich auch nicht um eine der von Clauberg, Helmreich und Vierthaler beschriebenen Wuchsformen. Andererseits ist hervorzuheben, daß, wie vor allem das biochemische Verhalten zeigt, diese Variation nicht gleichbedeutend mit einem Uebergang von Gravis zu Mitis war. Es kann daraufhin natürlich nicht die Unmöglichkeit eines solchen Ueberganges behauptet werden, durch die angewandte Methode konnte der Beweis für ein derartiges Vorkommen jedenfalls nicht erbracht werden.

Auffallend war die schnelle und leichte Reaktionsfähigkeit auf die Einwirkung des Nährmilieus. Es geht daraus hervor, daß das Koloniebild doch im ganzen als ein recht labiles Kennzeichen erachtet werden muß, und man muß sich fragen, ob eine solche „Angleichung" vielleicht auch unter natürlichen Verhältnissen vorkommen, somit ohne biochemische Kontrolle zu einem diagnostischen Irrtum führen könnte. Daß dies sich in dieser ausgesprochenen Form öfter ereignen sollte, ist allerdings sehr unwahrscheinlich. Die unter I wiedergegebenen Beobachtungen sprechen durchaus dagegen. Immerhin kann man auch daraus die Notwendigkeit der Berücksichtigung der biochemischen Leistungsprüfung ableiten (s. o.).

Was nun zum Schluß die Frage der Abwandlung in Richtung der Pseudodiphtherie betrifft, so können wir hierzu natürlich nur bedingt Stellung nehmen, da die Versuche nicht eigens ad hoc ausgeführt wurden und hierfür zu wenig umfangreich sein dürften. Die zum Teil beobachtete Abwandlung der Stäbchenform allein läßt wohl kaum Schlüsse in dieser Hinsicht zu, da kulturell gar keine Angleichung an die echte Pseudodiphtherie festzustellen war. In der Tatsache, daß von Gravis aus eine „Annäherung" an Mitis erfolgte, dagegen nicht von Mitis an Gravis, könnte man aber an sich schon einen Hinweis dafür erblicken, daß der Mitistyp seinem Wesen nach der saprophytären Pseudodiphtherie näher steht und seine Entstehung einer Abwandlung des Gravis bzw. vielleicht auch des Intermedius verdankt. Pesch sah in alternden Brühekulturen von Intermediusstämmen gerade den Mitistyp auftreten. Es wäre möglich, daß das Verfahren der Einwirkung von Abwasser auch bezüglich dieser Frage weiterführen könnte.

Zusammenfassung.

1) Für die Typendifferenzierung, der die Diphtheriediagnose mit dem Indikatornährboden nach Clauberg vorausgegangen war, hat sich ein neuer, von Clauberg angegebener, oben näher bezeichneter Nährboden bewährt. Es scheint, daß für gewöhnlich das auf diesem Nährboden sehr charakteristische Koloniebild als maßgebend für den Typ angesehen werden kann.

Auf die Prüfung der Vergärung von Kohlehydraten kann offenbar nicht gänzlich verzichtet werden.

2) Es wird die Verteilung der Typen auf ein Material von 594 positiven Befunden bei 260 Krankheitsfällen und 17 Keimträgern beschrieben und die Frage von Typenwechsel und -konstanz im Verlauf von Erkrankungen und bei Keimträgern mit häufiger positiven Befunden untersucht und erörtert.

3) Bei 2 Diphtheriestämmen vom Typ Gravis konnten durch Einwirkung von sterilem Abwasser Varianten gezüchtet werden, die auf festen Differenzierungsnährböden völlig, auf Brühe zum Teil dem Typ Mitis entsprachen. Das biochemische Verhalten gegenüber Stärke blieb dabei unverändert. Bei Typ Mitis und Intermedius (je 1 Stamm) konnte bei gleicher Methode eine stärkere Veränderlichkeit nicht beobachtet werden.

Schrifttum.

1) Schlirf, K., Zbl. Bakter. I Orig. **142** (1938). — 2) Herrmann, W., Z. Hyg. **121**, 540 (1939). — 3) Hohn, J., Ebenda **121**, 334 (1939). — 4) Ders., Ebenda **121**, 533 (1939). — 5) Clauberg, K. W., Zbl. Bakter. I Orig. **142** (1938). — 6) Preuner, R., Ebenda **136** (1936). — 7) Ders., Ebenda **137** (1937). — 8) Ders., Ebenda **138** (1937). — 9) Clauberg, Helmreich u. Vierthaler, Klin. Wschr. **1936**, 231. — 10) Pesch, K. L., Ebenda **1936**, 1202. — 11) Hammerschmidt, J., Ebenda **1935**, 964. — 12) Christison, N. H., Zbl. Bakter. I Orig. **133** (1934—1935). — 13) Schlossberger, H., Ebenda **135**, 6 (1935).

Der technischen Assistentin Fräulein Charlotte Shaw danke ich für ihre Mitarbeit bei der Durchfuhrung dieser Untersuchungen.

Untersuchungen zur Kultur des Gonokokkus.

Von Dr. **Gerhard Göhring**, Nürnberg.

Mit 1 Abbildung im Text.

Obwohl bereits über 50 Jahre seit der ersten Züchtung der Gonokokken durch Bumm vergangen sind, hat man bis in die neuere Zeit das bakteriologische Kulturverfahren zur Erkennung des Trippers in größerem Umfang nur selten herangezogen. Dies hat verschiedene Gründe: Die Erkennung des Trippers gelingt einerseits in der weitaus größten Anzahl der Fälle allein leicht durch die mikroskopische Untersuchung. Die Gonokokken bieten im Eiterausstrich, besonders bei Heranziehung der Gramschen Färbung, ein typisches Bild durch ihre Form und Lagerung. Andererseits ist die Züchtung der Gonokokken mit großen Schwierigkeiten verbunden. Durch ihre starke Empfindlichkeit gegenüber Temperaturschwankungen und Austrocknung ist eine Züchtung überhaupt nur in Kliniken möglich, die selbst über ein gut eingerichtetes Laboratorium verfügen. Die Ueberimpfung des eitrigen Sekretes muß direkt auf die Nährböden erfolgen und diese müssen dann möglichst bald in den Brutschrank gebracht werden. Infolgedessen ist die Anwendung der Kultur dem praktizierenden Arzt nur schwer möglich. Man hat deshalb neuerdings von bakteriologischer Seite (Christiansen und Becker) Thermosflaschen mit Nährböden angegeben, die nach Beimpfung an ein bakteriologisches Institut eingeschickt werden können.

Aber auch die Kultur selbst bietet noch verschiedene Schwierigkeiten. Der Gonokokkus gehört bezüglich der Züchtbarkeit zu den anspruchvollsten Bakterienarten und die Züchtung der Gonokokken gilt bis in die neuste Zeit als besonders schwierig. Dazu kommt noch, daß das mühsame und zeitraubende kulturelle Verfahren gegenüber der mikroskopischen Untersuchung keinen Vorteil zu bieten schien, da eine Ueberlegenheit des kulturellen Nachweises der Gonokokken über die mikroskopische Untersuchung nicht festgestellt werden konnte. Infolgedessen hat man bisher die Kultur nur in Ausnahmefällen angewendet (z. B. bei gerichtlichen Entscheidungen, bei Heiratserlaubnis und eventuell als Abschlußuntersuchung nach der Provokation).

In den letzten Jahren wird nun im Gegensatz zu dieser bisher herrschenden Ansicht von verschiedenen Autoren eine Ueberlegenheit des Kulturverfahrens über die mikroskopische Untersuchung betont.

So berichten besonders Konrad, Fröhlich, Fischer und Jordan aus der Breslauer Klinik von der Ueberlegenheit des Kulturverfahrens, weiterhin Schubert und eine Reihe anderer, besonders amerikanischer Forscher (Philadelphy, McLeod, Coates, Happold, Priestley, Wheatley u. a. m.). Im Gegensatz dazu stellten Zieler und Hämel an einem großen Material fest, daß sie niemals durch die Kultur ein positives Ergebnis hatten, wenn nicht auch im mikroskopischen Präparat Gonokokken zu finden waren. Allerdings konnte zuweilen durch das Kulturverfahren früher ein positives Ergebnis erzielt werden als durch die mikroskopische Untersuchung.

Dies betont auch Felke für die Erkennung des Trippers aus dem Gebärmutterhalskanal. Bei Prostituiertenuntersuchungen wurde gleichzeitig neben einer mikroskopischen Untersuchung das Kulturverfahren angewendet. In 12 Proz. konnten nur durch die Kultur Gonokokken gefunden werden. Die Ergebnisse Felkes zeigen eine Ueberlegenheit des Kulturverfahrens, wenn nur eine einzige mikroskopische Untersuchung vorgenommen wird. Dies konnten zum Teil Erler und Schmitz aus der Zielerschen Klinik bestätigen. In 9,4 Proz. waren nur durch die Kultur Gonokokken nachweisbar. Bei weiterer täglicher mikroskopischer Untersuchung konnten allerdings später bei diesen Fällen auch mikroskopisch Gonokokken festgestellt werden. Daß die mikroskopische Untersuchung nicht vernachlässigt werden darf, zeigt, daß in 6,4 Proz. nur mikroskopisch Gonokokken gefunden werden konnten. Bei frischem Tripper und während der Tripperbehandlung sahen Wolfram und Kaplan keine Ueberlegenheit des Kulturverfahrens, dagegen in geringem Maße bei der Feststellung der Heilung des Trippers.

In letzter Zeit berichtet nun Neumann, daß es ihm gelungen sei, durch Verbesserung des Züchtungsverfahrens wesentlich bessere Ergebnisse zu erzielen. Er konnte nachweisen, daß die Gonokokken am besten bei Sauerstoffarmut (sog. C-Platte) bzw. in einer sauerstoffarmen, aber kohlensäurereichen Atmosphäre (D-Platte) wachsen, ja daß manche Gonokokkenstämme bei aerober Züchtung (A-Platte) überhaupt nicht angehen. Er bezeichnet die Stämme, die nur auf der C- und D-Platte wachsen, als C- und D-Stämme. In 28 Proz. fand er C- und D-Stämme, also Stämme, die bei der bisher nur üblichen aeroben Züchtung nicht erfaßt worden wären. Dadurch erzielte er eine wesentliche Ueberlegenheit der Kultur über die mikroskopische Untersuchung. Seine Angaben werden bestätigt von Tauber, Krückeberg, Wendlberger und Dolega, Winkler, zum Teil auch von Albrecht. (Nähere Zahlenangaben folgen im Text.)

Bei der großen Bedeutung der Frage, inwieweit das Kulturverfahren der mikroskopischen Untersuchung überlegen ist, erscheint es berechtigt, über meine jahrelang durchgeführten Untersuchungen[1]) zu berichten. Das Material erstreckt sich auf 610 Kulturen bei 610 Fällen mit der üblichen aeroben Kulturmethode. In letzter Zeit wurde auch das Kulturverfahren von Neumann angewendet, und zwar bei 1169 Kulturen von ca. 300 Fällen.

Bei der Schwierigkeit der bakteriologisch kulturellen Diagnostik der Gonokokken halte ich es für wichtig, darauf hinzuweisen, daß die gesamten Kulturen stets unter meiner Leitung angefertigt und von mir selbst ständig durchgesehen wurden. Ich halte es ferner für zweck-

1) Die Untersuchungen wurden während meiner früheren Tätigkeit am Hygienischen Institut Würzburg und an den Hautkliniken Nürnberg und Königsberg/Pr. durchgeführt. Für die Erlaubnis zur Durchführung der Untersuchungen bin ich meinen früheren Chefs, Herrn Geheimrat Lehmann und Herrn Prof. Birnbaum zu großem Dank verpflichtet.

mäßig zu betonen, daß ich mich selbst seit 10 Jahren experimentell mit der Gonokokkenzüchtung befasse und über eine über 4jährige bakteriologische Ausbildung verfüge. Denn nach genauester Durchsicht der Literatur möchte ich mit Jaddassohn darauf hinweisen, daß die ungewöhnlich hohe Zahl positiver Resultate von verschiedenen Autoren mit größter Vorsicht gewertet werden muß. „Es ist wohl kein Zweifel mehr möglich, daß diesen Zahlen eine irrtümliche bakteriologische Diagnostik zugrunde liegt" (Jadassohn).

Nährböden.

Im Schrifttum ist eine große Anzahl von Nährböden für Gonokokkenzüchtung angegeben. Man kann wohl ohne Uebertreibung sagen, daß fast jeder Forscher einen eignen Nährboden empfiehlt, mit dem er die besten Ergebnisse erzielt haben will. Bis in die neuste Zeit ist die Frage nach dem „besten" Nährboden noch umstritten.

Nachdem Bumm die Züchtung der Gonokokken auf menschlichem Blutserum gelungen war, sind bis in die neuste Zeit Serum- bzw. Blutagar oder als Ersatz Aszitesagar die gebräuchlichsten Nährböden geblieben. Tierblut und Tierserum haben sich wenig bewährt. Als „brauchbarster Ersatz" (J. Koch) des menschlichen Eiweißes wird Pferdeblut angegeben, und zwar in Form des Kochblutagars. Eine Reihe von Forschern, besonders Bakteriologen, für die die Beschaffung von menschlichem Blut und Aszites mit Schwierigkeiten verbunden war, haben ihn mit gutem Erfolg angewendet. Für das gute Wachstum der Gonokokken auf diesem Nährboden wird der Gehalt an Hämatin und vitaminösen Substanzen verantwortlich gemacht. Auf ähnlichen Ueberlegungen beruht der von Casper und Bieling angegebene Pferdeblutwasseragar, der neuerdings sehr empfohlen wird.

Von den neueren Untersuchern verwenden die Breslauer und Würzburger Klinik sowie Wolfram und Kaplan nur Aszitesagar. Hämel betont, daß er nach vergleichenden Untersuchungen mit verschiedenen anderen Nährböden keine Veranlassung gesehen habe, den Aszitesagar zugunsten in neuerer Zeit empfohlener Nährböden aufzugeben. Felke benutzt wegen des ungleichmäßigen Eiweißgehaltes des Aszites einen Agar, dem gleiche Teile Aszites und Menschenblut zugegeben werden. Schubert und Neumann bevorzugen den Casper-Bielingschen Pferdeblutwasseragar. Wendlberger und Dolega hatten bessere Ergebnisse mit Menschenblut, auch Philadelphy gibt Menschenblut den Vorzug. Vergleichende Untersuchungen mit fünf verschiedenen Nährböden hat Mak angestellt. Blutagar ergab die besten Resultate, Aszites- und Hirnagar waren ihm erheblich unterlegen, als gänzlich unzuverlässig erwiesen sich Thalmanns Agar und Vedders Stärkeagar.

Bei den 610 Kulturen, die von mir unter aeroben Bedingungen angelegt wurden, wurden größtenteils zwei verschiedene Nährböden nebeneinander verwendet, indem das zu untersuchende Material gleichzeitig auf zwei Petrischalen mit verschiedenen Nährböden ausgestrichen wurde. Es kamen in der Hauptsache der von mir früher angegebene 20proz. Menschenblutagar und 25proz. Aszitesagar sowie 20proz. Blutagar und Kochblutagar nebeneinander in Anwendung. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in folgender Tabelle dargestellt.

Wie die Tabelle zeigt, ist am auffallendsten, daß bei gleichzeitiger Verwendung von Blutagar und Aszitesagar nur in 27,8 Proz. ein Wachstum auf beiden Nährböden gleichzeitig auftrat. Aehnlich ist das Ergebnis bei gleichzeitiger Benutzung von Blutagar und Kochblutagar. Hier trat ebenfalls nur in 24,8 Proz. ein Wachstum auf beiden Nährböden gleichzeitig auf. Bei den Kulturen, bei denen nur auf einem Nährboden Gonokokken züchtbar waren, zeigt sich der Blutagar deutlich überlegen über den Aszitesagar (40,0:32,2 Proz.) und als wesentlich überlegen über den Kochblutagar (54,0 : 21,2 Proz.).

Die Tabelle zeigt weiterhin, daß trotz der Ueberlegenheit des Blutagars über den Aszitesagar und Kochblutagar, dieser in keiner Weise alle übrigen Nährböden völlig ersetzen kann und einen Idealnährboden für die Gonokokkenzüchtung darstellt. Denn in 32,2 Proz. bzw. 21,2 Proz. ist nur auf

Tabelle I.

I. Vergleichendes Wachstum auf 20proz. Blutagar und 25proz. Ascitesagar				
Gesamtzahl der Kulturen	Zahl der positiven Kulturen	positiv auf Blutagar und Aszitesagar	positiv auf Aszitesagar, negativ auf Blutagar	positiv auf Blutagar, negativ auf Aszitesagar
231	90	27,8 Proz.	32,2 Proz.	40,0 Proz.
II. Vergleichendes Wachstum auf 20proz. Blutagar und Kochblutagar				
Gesamtzahl der Kulturen	Zahl der positiven Kulturen	positiv auf Blutagar und Kochblutagar	positiv auf Kochblutagar, negativ auf Blutagar	positiv auf Blutagar, negativ auf Kochblutagar
278	113	24,8 Proz.	21,2 Proz.	54,0 Proz.

Aszitesagar bzw. auf Kochblutagar ein Wachstum von Gonokokken eingetreten, während auf der gleichzeitig benutzten Blutagarplatte Gonokokken nicht züchtbar waren. D. h. wäre nur Blutagar verwendet worden, so wäre das Gesamtzüchtungsergebnis in 32,2 bzw. 21,2 Proz. schlechter ausgefallen. Nach diesen Untersuchungen dürfte es also zu empfehlen sein, gleichzeitig nebeneinander zwei verschiedene Nährböden zu benutzen, z. B. Blutagar und Aszitesagar.

Einige orientierende Untersuchungen wurden auch mit dem von Felke angegebenen Aszitesblutagar vorgenommen. Da keine besseren Ergebnisse gegenüber Blutagar zu erzielen waren, wurde von einer weiteren Verwendung dieses Nährbodens abgesehen. Auch durch Zusatz von 2 Proz. Traubenzucker zum Blutagar, was Levinthal empfiehlt, ergaben sich keine besseren Resultate.

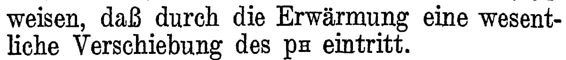
Da bei der Züchtung die Begleitbakterien häufig sehr störend wirken, war man von jeher bemüht, einen Elektivnährboden für Gonokokken herzustellen. Die von einigen Forschern (Nand Lal, Erikson und Albert, Mulsow u. a. m.) angegebenen Nährböden haben sich aber nicht bewährt. Auch differentialdiagnostische Nährböden, wie man sie bei der Typhuszüchtung kennt, die das Auffinden der Kolonien erleichtern, haben bisher keine praktische Bedeutung erlangt. Es wurde deshalb von mir versucht, eine biologische Eigenschaft der Gonokokken, nämlich die Säuerung von Traubenzucker, differentialdiagnostisch zu verwerten durch Anwendung des von Lingelsheim angegebenen Lackmusagars. Auf diesem Traubenzucker-Lackmus-Aszitesagar entsteht durch die Säuerung von Traubenzucker um die Gonokokkenkolonie ein roter Hof. Ein Vorteil im Aufsuchen der Gonokokkenkolonien ließ sich aber nicht erzielen, da auch eine große Anzahl von Begleitbakterien Traubenzucker säuerte.

In diesem Zusammenhang soll die Oxydasereaktion erwähnt werden, die von McLeod zur Erkennung der Gonokokkenkolonien auf den Nährböden als nützliches Hilfsmittel angegeben wurde und die neuerdings von Christiansen und Becker wieder empfohlen wird. Die technische Ausführung der Reaktion ist sehr einfach: man übergießt den Nährboden mit Paraphenylendiamin und gießt sofort die Flüssigkeit wieder ab. Die Gonokokkenkolonien färben sich innerhalb einer Minute blauschwarz. Bei einer großen Anzahl von Untersuchungen habe ich diese Methode angewendet in der Weise, daß, wenn mehrere mikroskopische Präparate von verschiedenen Kolonien keine Gonokokken ergaben, die Platte dann noch mit Paraphenylendiamin übergossen wurde. Hierdurch und durch eine Reihe experimenteller Untersuchungen mit aus der Mundhöhle angelegten Kulturen konnte ich feststellen, daß nicht nur Microc. catarrh. und andere gramnegative Mundkokken ebenfalls die Oxydasereaktion ergaben, sondern auch andere Begleitbakterien aus dem Tripperetter. Außerdem konnten kaum jemals noch durch diese Methode mehr Gonokokkenkolonien aufgefunden werden als mit der üblichen Betrachtung. Andererseits zeigt die Methode verschiedene Nachteile. Eine Abimpfung von übergossenen Platten ist sehr schwierig, da einmal die Gonokokken viel schwerer wieder angehen und weiterhin durch das Uebergießen eine Reihe von Kolonien von Begleitbakterien abgeschwemmt werden und dadurch die Gonokokkenkolonien verunreinigen.

Als Nähragar wird von den meisten Autoren 2—3proz. Fleischwasseragar mit 1 Proz. Pepton angegeben. Die gebräuchlichste Fleischart ist Rind-

fleisch (Neumann, Tauber), Felke bevorzugt Kalbfleisch, Wendlberger benutzt Plazentaagar. Von einigen Untersuchern (Levinthal, Felke) wird nur Pepton Witte als brauchbar bezeichnet. Besonderer Wert wird auf die p_H-Zahl gelegt. p_H 7,2—7,4 wird am häufigsten empfohlen (Tauber, Felke, Christiansen), einige Forscher (Neumann, Wendlberger) bevorzugen p_H 7,4—7,6. Ich selbst habe immer einen 2,5—3proz. Rindfleischagar mit 1 Proz. Pepton Witte und einer p_H-Zahl 7,2—7,4 verwendet.

Der verwendete Aszites wurde steril in Kölbchen aufgefangen und ohne jeden Zusatz im Eisschrank aufbewahrt. In bakteriologischen Instituten ist zur Konservierung des Aszites ein Zusatz von 2 Proz. Chloroform üblich. Hiervon wurde abgesehen, da einige Forscher (Levinthal, Schubert, Felke) ungünstige Erfahrungen mit dem durch Chloroform konservierten Aszites gemacht hatten. Auch die häufig geübte Erwärmung auf 60° scheint nicht unbedenklich zu sein. Christiansen und Becker konnten nachweisen, daß durch die Erwärmung eine wesentliche Verschiebung des p_H eintritt.



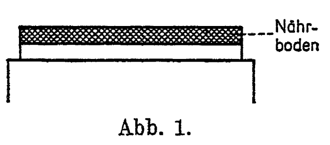


Abb. 1.

Das zum Blutagar verwendete Blut wurde durch Aderlaß gewonnen und durch Schütteln mit Glasperlen defibriniert. Der Kochblutagar wurde genau nach der Vorschrift von J. Koch hergestellt. Als Blutart diente Menschenblut.

Wie ich bereits oben erwähnt habe, wurde in letzter Zeit nur noch die Methodik nach Neumann angewendet. Wir haben die Angaben von Neumann genau befolgt mit Ausnahme von einigen Punkten, die im folgenden besprochen werden sollen.

Neumann verwendet ausschließlich den Bieling-Casperschen Pferdeblutwasseragar. Er hat die Caspersche Vorschrift insofern abgeändert, als er anstatt 50 Proz. nur 20 Proz. Blutwasser zum Nähragar gibt. Nur in einigen Vorversuchen hat er Menschenblut und Aszites benutzt und dabei festgestellt, daß Menschenblut dem Aszites überlegen ist. Wie oben festgestellt wurde, empfiehlt es sich, zwei verschiedene Nährböden nebeneinander zu verwenden. Dies macht nun bei dem Neumannschen Verfahren verschiedene Schwierigkeiten, da sowieso bei jedem Kranken eine Serie von drei Platten (A-, C-, D-Platte) angelegt werden muß. Bei Verwendung von zwei Nährböden müßten dann sechs Platten beimpft werden, was wohl bei frischen Krankheitsfällen keine Schwierigkeit bereiten würde, bei chronischen aber wegen Mangels an eitrigem Sekret unmöglich wäre. Nachdem 20proz. Menschenblutagar in den oben mitgeteilten Versuchen die besten Resultate gezeigt hatte, wurde weiterhin dieser Nährboden verwendet. Auch bereitet in einer Klinik die Beschaffung von Menschenblut (Aderlässe, Blutwaschungen usw.) keine Schwierigkeiten, dagegen ist die Beschaffung von sterilem Pferdeblut häufig nicht einfach, und auch die Haltbarkeit des Blutwassers ist sehr begrenzt (Felke). Trotzdem habe ich, um etwaigen Einwendungen begegnen zu können, in weiteren 100 Fällen auch den Pferdeblutwasseragar benutzt, aber in keiner Weise ein besseres Ergebnis erhalten als mit 20proz. Menschenblutagar.

Eine weitere Abänderung war folgende: Aehnlich wie Felke benutzten wir nicht Glasplatten, auf die die den Nährboden enthaltende halbe Petrischale aufgelegt wird, sondern setzten diese Schale auf den Petrischalendeckel auf (siehe Abb. 1). Hierdurch wird praktisch das gleiche erreicht ohne die geringsten Unkosten. Selbstverständlich dürfen nur Petrischalendeckel verwendet werden, die um einiges größer sind als die Unterschalen. Dieses Verfahren konnten wir um so leichter anwenden, als wir nicht wie Neumann Plastilin zum Verschluß benutzten, sondern das in den letzten Jahren hauptsächlich angewandte Zeresin. Das von Friedr. E. Koch eingeführte Zeresin[1]) hat bei gleichen Eigenschaften wesentliche Vorteile gegenüber dem Plastilin. Es gestattet ein sauberes Arbeiten und vereinfacht die Technik wesentlich. Sofort nach Bekanntwerden der Kochschen Arbeit haben wir deshalb das Arbeiten mit Plastilin aufgegeben und benutzen nur noch Zeresin (auch zur Züchtung von Anaerobieren) mit bestem Erfolg. Zeresin wird in einem Gefäß über der Bunsenflamme verflüssigt (75—95°) und dann aus einer Pipette oder Olive um die aufgesetzte Petrischale auslaufen lassen, wo es sofort erstarrt. Die von

1) Erhältlich von der Fa. Th. C. Fromm, Köln-Hedheim unter der Bezeichnung „Zeresin für Anaerobierzüchtung nach Dr. Koch". Preis für 1 kg RM 1.10.

Neumann beim Plastilin festgestellte Eigenschaft einer Ventilwirkung, indem zuerst im Brutschrank in der Platte ein Ueberdruck, bei Zimmertemperatur aber dann ein Unterdruck entsteht, besteht ebenfalls beim Zeresinverschluß, wie man sich leicht überzeugen kann. Weiterhin sprechen für die gleiche Wirkung meine annähernd gleichen Ergebnisse auf der C- und D-Platte.

Technische Bemerkungen.

Von allen Untersuchern wird großer Wert darauf gelegt, daß nur frisch hergestellte Nährböden zur Gonokokkenzüchtung verwendet werden. Selbst bei Aufbewahrung im Eisschrank müssen fertig gegossene Platten innerhalb einiger Tage verbraucht werden. Die Ursache dafür, daß auf älteren Nährböden die Züchtungsergebnisse wesentlich schlechter sind, liegt wahrscheinlich in dem sich ändernden Feuchtigkeitsgehalt des Nährbodens. Ich habe deshalb immer stets frisch gegossene Nährböden verwendet. Die längste Aufbewahrungszeit der gegossenen Platten betrug 12—14 Std.

Die Abnahme des Sekretes erfolgte stets mit der Platinöse nach gründlicher Reinigung der Harnröhrenmündung bzw. des Gebärmutterhalskanals. Auf einer Platte wurde stets nur das Sekret eines Kranken ausgestrichen. Beim Mann wurde für den Abstrich aus der Harnröhre eine ganze Platte verwendet, bei der Frau die Platte geteilt für die Abstriche aus der Harnröhre und aus dem Gebärmutterhalskanal. Das Sekret wurde über die ganze Platte durch Ausstriche verteilt, um möglichst die ganze Oberfläche des Agars auszunutzen und dadurch eine Ueberwucherung durch Begleitbakterien zu verhindern. Auf eine Platte das Sekret von mehreren Kranken zu verimpfen, wie das von einigen Autoren empfohlen wird, halte ich aus den angeführten Gründen nicht für zweckmäßig.

Wie in der Einleitung bereits betont wurde, müssen die beimpften Platten sofort in den Brutschrank gebracht werden. Die geeignetste Temperatur für das Wachstum der Gonokokken ist 37°, eher etwas niedriger, auf keinen Fall aber höher. An anderer Stelle habe ich früher ausgedehnte experimentelle Untersuchungen über die Temperaturempfindlichkeit der Gonokokken veröffentlicht. Auch durch die vorliegenden Untersuchungen konnte ich meine damalige Feststellung, daß die günstigste Temperatur für die Erstzüchtung der Gonokokken zwischen 36 und 37° liegt, wieder bestätigen.

Dagegen möchte ich an dieser Stelle nochmals auf eine damalige Feststellung hinweisen, daß zur Aufbewahrung lebender Gonokokkenkulturen eine Temperatur von 27—28° am geeignetsten ist. Bekanntlich ist es notwendig, um Gonokokken längere Zeit am Leben zu erhalten, sie alle 2—3 Tage auf neue Nährböden zu bringen. Durch ein Wachstum bei einer Temperatur von 27—28° ist es mir gelungen, die Gonokokken ohne Weiterüberimpfung wesentlich länger lebensfähig zu erhalten. Das Wachstum geht langsamer vor sich, ist aber dann üppiger als bei 37°. Durchschnittlich konnten Gonokokken noch nach 3—4 Wochen abgeimpft werden, besonders wenn man die Fortzüchtung im sog. Agarstichverfahren vornimmt.

Die Ablesung der Wachstumsresultate erfolgte im allgemeinen nach 48 Std. Bei den aeroben Platten wurden allerdings schon nach 24 Std. die Platten daraufhin durchgesehen, ob schon für Gonokokkenkolonien sprechende Kolonien vorhanden waren. War dies der Fall, so wurden bereits jetzt mikroskopische Präparate angefertigt, sonst die Platten weitere 24 Std. bebrütet. Waren auch jetzt keine Gonokokken nachweisbar, so wurden die Platten nochmals 24 Std. in den Brutschrank gestellt. Die besten Ergebnisse erhielten wir bei einer Ablesungszeit von 48 Std., in allerdings sehr vereinzelten Fällen war erst ein Wachstum nach 72 Std. erkennbar. Neumann hält nach seinen Ergebnissen eine längere Beobachtungszeit als 48 Std. für zwecklos. Dem kann aus den angeführten Gründen nicht beigestimmt werden.

Kolonien.

Das Aussehen der Gonokokkenkolonie zeigte je nach dem Nährboden geringe Verschiedenheiten. Doch läßt sich immerhin allgemein sagen, daß die einzelnen Kolonien etwa stecknadelkopf-, manchmal bis erbsengroß, rundlich, gering erhaben und schleimig zusammenhaltend sind. Besonders auf der Aszitesplatte, weniger auf der Blutplatte, werden die Kolonien häufig so stark schleimig und klebrig, daß es unmöglich ist, einen Teil der Kolonie mit der Oese abzunehmen. Die Farbe der Kolonien ist leicht grau, durchscheinend, tautropfenähnlich. Neumann und Winkler sahen manchmal eine gelbbräunliche Verfärbung. Ich selbst habe dies bei Erstzüchtungen nie beobachten können, sondern nur bei älteren Laboratoriumsstämmen. Bei sehr üppigem Wachstum kommt es zu einem Zusammenfließen der Kolonien, doch sind die Grenzen der einzelnen Kolonien meistens noch deutlich erkennbar.

Als besonders wertvoll wird angesehen, daß der Gonokokkus im Gegensatz zu einer großen Anzahl von Begleitbakterien den Blutnährboden nicht hämolytisch verändert. Darin wird von einigen Untersuchern ein großer Vorteil der Blutplatte gegenüber dem Aszitesagar erblickt. Dem bakteriologisch weniger Geübten mag diese Eigenschaft des Gonokokkus das Aufsuchen der Kolonien erleichtern, dem Erfahrenen aber, der auch die Begleitbakterien an ihrer Kolonieform zu unterscheiden vermag, dürfte auch das Auffinden der typischen Gonokokkenkolonie auf der Aszitesplatte keine Schwierigkeiten bereiten. Der Wert dieser „negativen Auslese“ wird noch dadurch eingeengt, daß außer dem Gonokokkus auch alle gramnegativen Kokken, deren Kolonieformen zum Teil der Gonokokkenkolonie sehr ähnlich sind, eine Hämolyse nicht hervorrufen.

Mikroskopische Untersuchung.

Es braucht wohl nicht besonders hervorgehoben zu werden, daß zur Diagnose der Gonokokken im mikroskopischen Ausstrich nur die Gramfärbung verwendet werden darf. Ich habe mich bei der Ausführung der Gramfärbung nach der Vorschrift gerichtet, die Lehmann-Neumann in ihrem Handbuch geben. Auf einen Punkt glaube ich aber besonders hinweisen zu müssen. Von manchen Autoren (Neumann u. a. a.) wird zur Entfärbung des nach Gram gefärbten Präparates in absolutem Alkohol eine bestimmte Zeit z. B. eine ½ Min. angegeben. Wir haben mit Lehmann-Neumann die Präparate nicht nach einer bestimmten Zeitdauer entfärbt, sondern solange bis der Alkohol keinen Farbstoff mehr annahm. Die Zeitdauer ist bei den verschiedenen Präparaten je nach der Dicke des Ausstriches sehr verschieden und schwankt zwischen einer ½ Min. und mehreren Minuten. Hierauf glaube ich besonders hinweisen zu müssen, da wir uns überzeugen konnten, daß bei einer Reihe von Präparaten bei Außerachtlassen dieser Vorschrift völlig falsche mikroskopische Bilder entstanden.

Weiterhin ist selbstverständlich nur dann eine einwandfreie mikroskopische Diagnose möglich, wenn die Diplokokken von einer einzigen Kolonie stammen. Darauf weist mit Recht besonders Neumann hin. Jede Beimischung anderer Kokkenarten oder gramnegativer Kurzstäbchen macht eine sichere Erkennung unmöglich. Wenn in weiteren Präparaten ein reiner Ausstrich nicht zu erreichen ist, muß eine Subkultur versucht werden.

Das Aussehen der Kulturgonokokken ist im mikroskopischen Präparat äußerst charakteristisch durch ihre Form und Lagerung. An anderer Stelle habe ich ausführliche Untersuchungen darüber veröffentlicht. Hier will ich nur auf folgendes hinweisen: Die Gonokokken zeigen immer die ihnen typische

Kaffeebohnenform. Die Größe der einzelnen Kokken ist verschieden je nach der Zusammensetzung der Nährböden, dem Alter der Kolonien, den Wachstumsbedingungen usw. Häufig konnte beobachtet werden, daß derselbe Stamm auf den Neumannschen A-C-D-Platten auf jeder Platte verschiedengroße Kokken aufwies. Ja, manchmal zeigten Kokken von verschiedenen Kolonien auf derselben Platte geringe Größenunterschiede. Die Lagerung der einzelnen Kokken zueinander ist bei den Gonokokken gekennzeichnet durch ihre Unregelmäßigkeit. Man sieht niemals eine bestimmte Anordnung, wie z. B. Trauben- oder Sarzineformen, man kann sogar sagen, wenn eine derartige Anordnung auftritt, es niemals Gonokokken sind.

Das charakteristischste im mikroskopischen Bild sind aber die sog. Degenerationsformen, die ich an anderer Stelle als „Zerfallsformen" bezeichnet habe. Schon nach 24stünd. Bebrütung sieht man im mikroskopischen Präparat, daß ein Teil der Gonokokken sich schwächer färben und ihre Gestalt und Form verlieren. Mit zunehmender Zeit nehmen die gut gefärbten Kokken ständig ab zugunsten der Zerfallsformen, so daß nach 72 Std. und später im Gesichtsfeld nur hie und da noch gut gefärbte und geformte Diplokokken gefunden werden, während sonst nur zerfallene Formen (Detritus) vorhanden sind.

Dieses schnelle Auftreten der Zerfallsformen ist unter den gramnegativen Kokken nur den Gonokokken eigentümlich, wie ich das in zahlreichen Versuchen mit Meningokokken und gramnegativen Mundkokken bereits fruher nachgewiesen und beschrieben habe. Bei den gramnegativen Mundkokken treten Zerfallsformen kaum auf, bei den Meningokokken in weitaus geringerem Maße als bei Gonokokken.

Dieser langsame Zerfall der Gonokokken auf den Nährböden (Bumm spricht von „Hinfälligkeit") ist außer von autolytischen Prozessen auch von der Temperatur und von dem Feuchtigkeitsgehalt der Nährböden abhängig. In flüssigen Nährböden und bei niedrigerer Temperatur (27—28°) treten die Zerfallsformen wesentlich langsamer auf.

Nach meinen bisherigen Erfahrungen ist das Auftreten der Zerfallsformen die konstanteste Eigenschaft der Gonokokken und allen anderen differentialdiagnostischen Merkmalen weitaus überlegen, auch der Zuckervergärungsprobe nach Lingelsheim.

Zuckervergärung.

Lingelsheim hat als erster darauf hingewiesen, daß die gramnegativen Kokken sich durch ihr Vergärungsvermögen von verschiedenen Zuckerarten unterscheiden. Hier an dieser Stelle ist nur von Wichtigkeit, darauf hinzuweisen, daß sich der Gonokokkus durch das Vermögen, allein Dextrose zu säuern, von den übrigen gramnegativen Kokken unterscheidet. Von einigen Autoren (Hämel u. a. m.) wird hiervon die Diagnose „Gonokokkus" abhängig gemacht. Diese Eigenschaft des Gonokokkus ist aber nicht konstant, einerseits dadurch, daß das Säuerungsvermögen oft sehr gering ist (Joachimovits) und dadurch nur schwer erkenn- und verwertbar, andererseits dadurch, daß es Stämme gibt, die Dextrose nicht vergären (Cohn, Nagell, Göhring) oder sogar solche, die verschiedene Zuckerarten vergären (Milochevitch, Gjorgjevic).

Mit dem Problem der Zuckervergärung der gramnegativen Kokken habe ich mich eingehend beschäftigt und bereits darüber berichtet. Ich konnte feststellen, daß diese Eigenschaft sehr variabel ist. Gonokokkenkulturen, die man längere Zeit auf Dextroseplatten hält, spalten sich in vergärende und nicht vergärende Stämme auf. Unter meiner Leitung haben zwei Doktoranden (Zill und Berning, Würzburg) ausgedehnte Untersuchungen über das Zuckervergärungsvermögen von gramnegativen Kokken angestellt. Sie konnten dabei eine große Veränderlichkeit im Vergärungsvermögen der einzelnen Arten feststellen. Eine Einteilung der Kokkenarten nach ihrem Vergärungsvermögen von verschiedenen

Zuckerarten führte zu ganz anderen Ergebnissen als die Einteilung nach morphologischen Gesichtspunkten. Zill konnte drei Stämme aus der Mundhohle von verschiedenen Personen züchten, die sich weder morphologisch noch durch die Vergärungsprobe von Gonokokken unterschieden. Der einzige Unterschied bestand darin, daß auch nach 72stund. Bebrütung keine Zerfallsformen gebildet wurden.

Auf Grund der eben angeführten .Erfahrungen habe ich die Zuckervergärung nur bei etwa $^2/_3$ der gezüchteten Stämme, die nach der aeroben Methode kultiviert wurden, ausgeführt. Bei fast allen Stämmen stimmte die durch das Auftreten der Zerfallsformen gestellte Diagnose mit der Vergärungsprobe überein. In einigen Fällen dagegen trat eine Vergärung von Dextrose nicht auf. Ich habe deshalb später die Diagnose „Gonokokkus" allein nach dem Auftreten der Zerfallsformen (natürlich bei gleichzeitiger Berücksichtigung der Kolonieform, der Lagerung, Gestalt usw.) gestellt und auf die Ausführung der Vergärungsprobe verzichtet.

Ergebnisse nach der Neumannschen Methodik.

In der Einleitung wurde bereits erwähnt, daß es Neumann dadurch gelungen ist, weit bessere Resultate zu erzielen, daß er bei jedem Züchtungsversuch drei verschiedene Platten anlegt, und zwar außer der üblichen aeroben Platte (A-Platte) eine sauerstoffarme (C-Platte), und weiterhin eine sauerstoffarme, aber kohlensäurereiche (D-Platte). Die Technik dieser Methode ist inzwischen so bekannt geworden, daß sie hier nicht wiederholt zu werden braucht. Bei 975 Kulturen habe ich diese Methode angewendet mit einer geringen Abänderung, wie sie oben bereits mitgeteilt wurde. Von diesen 975 Kulturen wurden 665 gleichzeitig auf A-C-D-Platten angelegt, 303 wegen Mangel an eitrigem Ausfluß nur auf C-Platten[1]) und sieben nur auf A-Platten. Zum Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren sind infolgedessen nur die erstgenannten 665 Kulturen verwertbar, unter denen sich 167 positive Züchtungen befanden. Das Wachstum auf den verschiedenen Platten gibt folgende Tabelle wieder.

Tabelle II.

Wachstum auf							
ACD-	A-	C-	D-	AC-	AD-	CD-	Platten
66	10	25	6	33	8	19	bei 167 positiven Kulturen

Das heißt also, wenn man nach Neumann je nach dem Wachstum auf den verschiedenen Platten eine Einteilung in „A-C-D-Stämme" vornimmt: 117 A-Stämme (70,0 Proz.), 44 C-Stämme (26,3 Proz.), 6 D-Stämme (3,7 Proz.). Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit den Befunden anderer Autoren zeigt Tabelle III.

Die Tabelle zeigt, wenn man von den völlig aus der Reihe fallenden Ergebnissen Wezels absieht, eine auffallende Uebereinstimmung der Ergebnisse aller Autoren. Im Durchschnitt finden sich in 69 Proz. „A-Stämme" und in 31 Proz. „C- und D-Stämme". D. h. also durch die Neumannsche Methode werden in 31 Proz. mehr positive Kulturen erhalten als mit der bisherigen aeroben Methode.

Aber die Neumannsche Methode bietet noch mehr Vorteile. Bei allen Züchtungen konnte beobachtet werden, daß die Gonokokkenkolonien auf

1) Obwohl es nach den Neumannschen Ergebnissen zweckmäßiger ist, wenn aus Materialmangel nur eine Platte angelegt werden kann, eine D-Platte anzulegen, haben wir davon abgesehen, weil die D-Platte weitaus häufiger durch Begleitbakterien überwuchert wurde als die C-Platte.

Tabelle III.

<table>
<tr><th>Autoren</th><th>A-Stämme in Proz.</th><th>C-Stämme in Proz.</th><th>D-Stamme in Proz.</th><th>C- und D-Stämme in Proz.</th><th>Anzahl der positiven Kulturen</th></tr>
<tr><td>Neumann . .</td><td>70,19</td><td>18,63</td><td>11,18</td><td>29,81</td><td>161</td></tr>
<tr><td>Neumann . .</td><td>72,0</td><td>19,0</td><td>9,0</td><td>28,0</td><td>679</td></tr>
<tr><td>Winkler . . .</td><td>63,8</td><td>8,5</td><td>27,7</td><td>36,2</td><td>47</td></tr>
<tr><td>Krückeberg .</td><td>62,5</td><td>25,0</td><td>12,5</td><td>37,5</td><td>80</td></tr>
<tr><td>Albrecht . . .</td><td>74,0</td><td colspan="2">26,0</td><td>26,0</td><td>312</td></tr>
<tr><td>Wezel . . . .</td><td>46,1</td><td>37,9</td><td>12.6</td><td>50,5</td><td>206</td></tr>
<tr><td>Gohring . . .</td><td>70,0</td><td>26,3</td><td>3,7</td><td>30,0</td><td>167</td></tr>
</table>

den C- und D-Platten weitaus üppiger, zum Teil auch größer wachsen als auf der A-Platte. Dadurch wird das Aufsuchen der Kolonien wesentlich erleichtert.

Auf eine Beobachtung soll besonders hingewiesen werden: Häufig konnte festgestellt werden, daß zwar auf den C- und D-Platten reichlich Gonokokkenkolonien vorhanden waren, während nur mit Mühe und nach langem Suchen auf der A-Platte eine einzige Kolonie gefunden werden konnte. Wenn man dieses berücksichtigt, kann man sich vorstellen, daß in nicht seltenen Fällen einzelne Kolonien auf der A-Platte übersehen werden, so daß in Wirklichkeit der Anteil der „A-Stämme" wesentlich höher ist. Weiterhin war auffällig, daß, wenn auf den C- und D-Platten nur einzelne kleine Kolonien vorhanden waren, auf der A-Platte fast nie Gonokokkenkolonien zu finden waren. Deshalb muß man sich die Frage vorlegen, ob überhaupt die Berechtigung vorhanden ist, allein nach einem besseren oder schlechteren Wachstum unter verschiedenen Züchtungsbedingungen die gezüchteten Gonokokken in verschiedene Stämme, d. h. Typen einzuteilen. Gundel, der sich in letzter Zeit eingehend mit diesen Fragen beschäftigt hat, definiert folgendermaßen: „Von einer Anerkennung der Typen innerhalb bestimmter Bakterienarten kann erst dann gesprochen werden, wenn ihre Herausdifferenzierung von gefestigten konstanten Merkmalen begleitet ist." Neumann betont selbst, daß die Einteilung in „A-C-D-Stämme" nur Gültigkeit hat in der Primärkultur, und daß diese „Eigenschaft" sehr häufig bereits in der Subkultur nicht mehr vorhanden ist. Man könnte sich deshalb vorstellen, daß die C- und D-Platten nur einen besseren „Nährboden" darstellen und nicht die Gonokokken von vornherein verschiedene Eigenschaften aufweisen. Für diese Auffassung spricht einmal die obige Beobachtung. Andererseits konnte ich in einigen orientierenden Versuchen feststellen, daß auch die A-Stämme in einer zweiten Kultur auf den C- und D-Platten wesentlich besser wieder angehen als auf der A-Platte, ja es konnte sogar in einigen Fällen beobachtet werden, daß Abimpfungen von der A-Platte nur wieder auf der C- und D-Platte und nicht auf der A-Platte angingen. Diese Beobachtung würde dafür sprechen, daß nur das Züchtungsverfahren optimaler für das Gonokokkenwachstum ist. Eine Einteilung in verschiedene Stämme, d. h. Typen, wird nach dieser Auffassung nicht der gebräuchlichen Nomenklatur gerecht, sondern besitzt höchstenfalls Verständigungswert.

Man könnte sich auch die Frage vorlegen, ob die Reihenfolge, in welcher die Platten beimpft wurden, eine Rolle spielt insofern, wenn z. B. zuerst die D-Platte, dann die C-Platte und zum Schluß die A-Platte beimpft wurde, daß dann in der Hauptsache D- bzw. C-Stämme züchtbar waren. Wir haben deshalb bei jeder Kultur die Reihenfolge der Beimpfung gewechselt und einmal in der Reihenfolge ACD, ein andermal CDA, bzw. DAC usw. die Abimpfungen vorgenommen. Hierbei konnte festgestellt werden, daß die Reihenfolge der Beimpfung für das Züchtungsergebnis überhaupt keine Rolle spielt.

Weiterhin wurde zur Prüfung der gleichen Fragestellung, ob die besseren Ergebnisse der Neumannschen Methode vielleicht nur darin lägen, daß mehr Sekret durch Benutzung von 3 Platten (anstatt 1 Platte) verarbeitet würde, bei 94 Kulturen, bei denen am gleichen Tage das mikroskopische Präparat positiv war, das Sekret wechselnd auf 3 A-Platten, 3 C-Platten oder 3 D-Platten ausgestrichen. Läge das bessere Ergebnis nur in der Verwendung von mehr Platten, so müßte auf den verschiedenen Plattenserien das gleiche Ergebnis zu erzielen sein. Es ergab sich aber, daß auf den A-Platten wesentlich weniger positive Resultate erzielt wurden als auf den C- und D-Platten. Damit ist der überragende Wert der C- und D-Platten für die Gonokokkenzüchtung erwiesen.

Die Bedeutung der Kulturmethode für die Erkennung des Trippers.

Im folgenden sollen meine Ergebnisse durch das Kulturverfahren, verglichen mit den Resultaten anderer Autoren, mitgeteilt werden, und zwar getrennt nach dem Züchtungsverfahren, einmal mit der üblichen aeroben Methode, ein andermal nach der Methode nach Neumann. Es wurde hier nur berücksichtigt ein Vergleich der Kulturmethode mit dem mikroskopischen Präparat des gleichen Tages. Das mikroskopische Präparat wurde in allen Fällen gleichzeitig mit der Kultur angelegt. Nicht berücksichtigt ist hierbei, ob etwa vor oder nach dem Anlegen der Kultur das mikroskopische Präparat positiv war bzw. wurde.

In der folgenden Tabelle finden sich meine Ergebnisse mit der aeroben Kulturmethode verglichen mit den Resultaten anderer Autoren. Es wurden hierbei nur die neueren Arbeiten berücksichtigt[1]).

Tabelle IV.

Autoren	mikroskopisch ⊖ kulturell ⊖		mikroskop. + kulturell +		mikroskop. + kulturell ⊖		mikroskop. ⊖ kulturell +		Zahl der Kulturen
	Zahl der Kulturen	Proz.	Zahl der Kulturen	Proz.	Zahl der Kulturen	Proz.	Zahl der Kulturen	Proz.	
Weibliche Harnröhre									
Erler	309	71,2	64	14,7	25	5,7	36	8,2	434
Göhring	260	65,0	33	8,2	58	14,5	49	12,3	400
Gebärmutterhalskanal									
Felke	737	69,3	165	15,4	31	2,8	130	12,1	1063
Erler	301	69,3	64	14,7	28	6,4	41	9,4	434
Göhring	227	56,7	39	9,8	52	13,0	82	20,5	400

Wie die Tabelle zeigt, ist ein Vergleich der Ergebnisse Felkes mit denen Erlers ohne weiteres möglich, da sie prozentual gleichviele mikroskopische und kulturelle negative Resultate haben. Dagegen ist bei meinen Ergebnissen hierin verglichen mit den Ergebnissen der beiden Autoren ein wesentlicher Unterschied, so daß mir ein Vergleich eindrucksvoller erscheint, wenn man nur die positiven Befunde vergleicht. Dies zeigt Tabelle V.

Vergleichende Zahlen über die Kulturmethode bei männlicher Gonorrhöe habe ich in der Literatur der letzten Jahre nicht gefunden, so daß ich meine Ergebnisse hier nicht zahlenmäßig anführe. Es soll hier nur soviel gesagt sein, daß bei männlicher Gonorrhöe bei Abstrichen aus der Harnröhre (Anhangsgebilde wurden nicht untersucht) die mikroskopische Untersuchung dem Kulturverfahren überlegen ist, besonders wenn fast nur vorbehandelte Fälle zur Untersuchung kamen.

---

1) Die Ergebnisse von Christiansen und Becker konnten hier nicht berücksichtigt werden, da die Verff. nicht angeben, ob es sich um Kulturen von Männern oder Frauen handelt.

Tabelle V.

Autoren	mikroskop. + kulturell + in Proz.	mikroskop. + kulturell ⊖ in Proz.	mikroskop. ⊖ kulturell + in Proz.	von ... positiven Befunden
		Weibliche Harnröhre		
Erler	51,2	20,0	28,8	125
Göhring	23,6	41,4	35,0	140
		Gebärmutterhalskanal		
Felke	50,9	9,5	39,6	326
Erler	48,1	21,1	30,8	133
Göhring	22,6	30,0	47,4	173

Bei den Untersuchungsergebnissen aus der weiblichen Harnröhre ist nur ein Vergleich mit den Resultaten Erlers möglich, da Felke keine Kulturen aus der Harnröhre anlegte. Erler erhielt hier durch die Kultur in 80 Proz. positive Befunde, ich nur in 59 Proz., entsprechend sind bei mir die positiven mikroskopischen Befunde bei negativer Kultur doppelt so hoch.

Einen geringeren Unterschied zeigen die Untersuchungsergebnisse aus der Cervix. Felke hat in 90 Proz. positive Kulturbefunde, Erler in 79 Proz., ich in 70 Proz. Dementsprechend sind die positiven mikroskopischen Befunde bei negativer Kultur bei Felke 10 Proz., bei Erler 21 Proz., bei mir 30 Proz. Andererseits sind die positiven kulturellen Befunde bei negativen mikroskopischen Präparaten am höchsten bei mir (47 Proz.), etwas geringer bei Felke (40 Proz.), am niedrigsten bei Erler (31 Proz.). Man könnte an Hand dieser Zahlen verschiedene theoretische Möglichkeiten (Verschiedenheit des Krankengutes[1]) usw.) über den unterschiedlichen Ausfall der vorliegenden Untersuchungen erörtern, davon soll aber abgesehen werden.

Im folgenden sollen in der gleichen Weise die Ergebnisse mit der Neumannschen Kulturmethode wiedergegeben werden, die den obigen Aus-

Tabelle VI.

Autoren	mikroskopisch ⊖ kulturell ⊖		mikroskop. + kulturell +		mikroskop. + kulturell ⊖		mikroskop. ⊖ kulturell +		Zahl der Kulturen
	Zahl der Kulturen	Proz.	Zahl der Kulturen	Proz.	Zahl der Kulturen	Proz.	Zahl der Kulturen	Proz.	
				Männliche Harnröhre					
Neumann .	59	22,7	174	66,8	8	3,1	19	7,3	260
Göhring .	58	38,1	79	52,0	13	8,5	2	1,4	152
				Weibliche Harnröhre					
Albrecht .	21	42,9	15	30,6	2	4,0	11	22,5	49
Göhring .	434	84,6	34	6,6	10	2,0	35	6,8	513
				Gebärmutterhalskanal					
Albrecht .	5	10,2	24	48,9	—	—	20	40,9	49
Göhring .	428	83,4	28	5,5	8	1,5	49	9,6	513
Neumann .	3736	84,3	232	5,0	31	0,7	437	10,0	4436
Winkler .	118	70,7	11	6,5	2	1,2	36	21,6	167
Krückeberg	215	71,6	12	4,0	5	1,6	68	22,6	300

1) Unser Krankengut bestand größtenteils aus chronischen und vorbehandelten Fällen. Es wurde hierbei beobachtet, daß besonders bei vorbehandelten Fällen die Züchtung viel schwerer gelang als bei frischen, obwohl im mikroskopischen Präparat Gonokokken nachweisbar waren.

führungen entsprechend jetzt weitaus größeres Interesse verdienen. Aus den nach der Tabelle IV angeführten Gründen sind die Ergebnisse wieder in zwei Tabellen zusammengestellt (s. Tab. VI u. VII).

Tabelle VII.

Autoren	mikroskop. + kulturell + in Proz.	mikroskop. + kulturell ⊖ in Proz.	mikroskop. ⊖ kulturell + in Proz.	von ... positiven Kulturen
Männliche Harnröhre				
Neumann	86,6	4,0	9,4	201
Göhring	84,0	13,8	2,2	94
Weibliche Harnröhre				
Albrecht	53,5	7,2	39,3	28
Göhring	43,0	12,7	44,3	79
Gebärmutterhalskanal				
Albrecht	54,5	—	45,5	44
Göhring	33,0	9,4	57,6	85
Neumann[1] . . .	33,1	4,5	62,4	700
Winkler	22,5	4,0	73,5	49
Krückeberg . . .	14,1	5,9	80,0	85

1) Die Ergebnisse von Neumann, Winkler und Krückeberg sind nur bedingt an dieser Stelle zu verwenden, da die Untersuchungsergebnisse aus Cervix und Urethra nicht getrennt mitgeteilt werden. Die Zahlen stellen die Untersuchungsergebnisse der Cervix- und Urethrakulturen dar. — Neumann teilt seine Resultate in zwei Arbeiten mit. In der einen Arbeit werden 3276 Kulturresultate angeführt, in der anderen 4436. Da ich annehmen muß, daß in den 4436 Kulturen die 3276 enthalten sind, habe ich in der Zusammenstellung nur die 4436 berücksichtigt.

Die Tabelle zeigt folgendes:

1. Männliche Harnröhre: Eine Ueberlegenheit der Kultur über die mikroskopische Untersuchung zeigt sich bei Neumann in 10 Proz., bei mir nur in 2 Proz. Mikroskopisch positive Befunde bei negativer Kultur sind bei mir über dreimal so hoch als bei Neumann (14 : 4 Proz.).

2. Weibliche Harnröhre: Hier verändert sich das Bild schon wesentlich. Bei negativem mikroskopischen Präparat zeigt sich ein positiver Kulturbefund bei Albrecht in 39 Proz., bei mir in 44 Proz. Immerhin versagt die Kultur bei Albrecht in 7 Proz., bei mir in 13 Proz.

3. Gebärmutterhalskanal: Die Resultate sind hier bei den verschiedenen Autoren recht unterschiedlich. Den höchsten Prozentsatz bei negativem mikroskopischen Präparat und bei positiver Kultur hat Krückeberg (80 Proz.), den niedrigsten Albrecht (45 Proz.). Bei den übrigen Autoren liegen die Resultate in der Mitte zwischen beiden Werten. Albrecht hat gar keine Kulturversager, Neumann und Winkler in 4 Proz., Krückeberg in 6 Proz., ich in 9 Proz.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß besonders bei der Frau, hauptsächlich bei Cervixkulturen sich eine wesentliche Ueberlegenheit des Kulturverfahrens über die mikroskopische Untersuchung feststellen läßt. Aber immerhin finden sich auch in 5—10 Proz. Kulturversager!

Vergleicht man meine Untersuchungsergebnisse der aeroben Methode mit denen mit dem Neumannschen Verfahren, so finden sich bei der weiblichen Urethra in 29 Proz., bei der Cervix in 21 Proz. mehr positive Kulturresultate mit dem Neumannschen Züchtungsverfahren. Also zeigt sich auch hier bei der praktischen Anwendung der bedeutsame Fortschritt mit der Neumannschen Methode.

Schlußbetrachtung.

Betrachtet man nun auf Grund der vorliegenden Untersuchungen den augenblicklichen Stand der Frage, was leistet das Kulturverfahren im Vergleich mit der mikroskopischen Untersuchung für die Erkennung des Trippers, so kann man folgendes sagen:

Bei einmaliger Untersuchung ist das Kulturverfahren dem mikroskopischen Präparat überlegen. Dies kommt besonders zum Ausdruck bei der weiblichen Gonorrhöe und zwar hauptsächlich bei Abstrichen aus dem Gebärmutterhalskanal, in etwas geringerem Maße auch bei der Diagnose des Trippers der weiblichen Harnröhre. Bei der Erkennung des männlichen Trippers ist eine Ueberlegenheit des Kulturverfahrens nicht nachweisbar. Ebenso wie die Zielersche Klinik konnte ich feststellen, daß bei dem größten Teil meiner positiven Kulturbefunde bei täglicher weiterer Untersuchung auch noch mikroskopisch Gonokokken gefunden werden konnten. Nur in einigen Fällen, bei denen Gonokokken kulturell nachweisbar waren, konnten auch bei längerer mikroskopischer Kontrolle Gonokokken mikroskopisch nicht nachgewiesen werden. Vielleicht wäre es aber auch in diesen Fällen noch möglich gewesen, mikroskopisch Gonokokken zu finden, wenn man über die übliche Beobachtungszeit hinaus noch untersucht hätte[1]). Das Kulturverfahren bedeutet also hauptsächlich einen Zeitgewinn, da der Nachweis der Gonokokken häufig früher erfolgt als durch die mikroskopische Untersuchung, auch wenn man berücksichtigt, daß das Kulturverfahren erst nach 48 Std. Ergebnisse zeigt, währenddessen noch mehrere mikroskopische Präparate durchgemustert werden können[2]). Neben der frühzeitigeren Erfassung der Krankheitsfälle hat aber die Kultur noch einen besonderen Vorteil darin, daß eine große Anzahl zweifelhafter gramnegativer Kokken als Gonokokken identifiziert werden kann.

Was bedeutet das nun für die Erkennung des Trippers im allgemeinen? Hierbei muß berücksichtigt werden, daß ein absoluter Vergleich des Kulturverfahrens mit der mikroskopischen Untersuchung nur dann einwandfrei ist, wenn, was technisch auf Schwierigkeiten stößt, immer gleichzeitig und genau so häufig beide Untersuchungsmethoden angewendet werden. Wenn man aber täglich 1—2mal mikroskopisch untersucht und nur 1—2mal wöchentlich Kulturen anlegt, so ist es durchaus verständlich, daß die mikroskopische Untersuchung mehr positive Resultate liefern muß. Denn in einem Teil der Fälle, die in den Tabellen als kulturell und mikroskopisch negativ bei einmaliger Untersuchung mitgeteilt wurden, wurden bei weiteren Kulturen und noch häufigeren mikroskopischen Untersuchungen nur noch mikroskopisch Gonokokken gefunden[1]). Dies kann man aber nicht als ein Versagen der Kultur auffassen. Denn jeder erfahrene Kliniker weiß, daß nicht zu jeder Zeit, besonders bei der weiblichen Gonorrhöe, Gonokokken ausgeschieden werden. In einem Sekret, in dem keine Gonokokken enthalten sind, können sie auch durch die Kultur nicht nachgewiesen werden. So kommt es vor, daß die Kultur negativ ausfällt, weil am Tage der Abnahme keine Erreger im Sekret vorhanden waren, einige Tage später aber, an denen nur mikroskopische Untersuchungen angestellt wurden, Gonokokken mikroskopisch nachweisbar

1) Im allgemeinen wurde solange mikroskopisch und kulturell untersucht, bis beide Verfahren ein positives Ergebnis lieferten. Leider war dies aus äußeren Gründen nicht bei allen Patienten möglich, besonders bei solchen nicht, bei denen sowieso schon längere Zeit zur Feststellung des Trippers notwendig war. In diesen Fällen mußten wir uns, wenn der Befund eindeutig war, mit dem Nachweis durch ein Verfahren begnügen.

2) Bei dem größeren Teil der Fälle wurden allerdings schon während der 48stünd. Bebrütung der Platten Gonokokken mikroskopisch gefunden.

waren. Dies, d. h. die „Klinik der Gonorrhöe“ muß stets bei der Beurteilung der Frage berücksichtigt werden.

Weiterhin muß festgestellt werden, daß es in einem Teil der Fälle Kulturversager gibt, d. h. negative Kulturen bei positivem Präparat bei gleichzeitiger Abnahme des Sekretes. Infolgedessen ist eine gewissenhafte Durchmusterung der Präparate auch durch die Anwendung der Kultur in keiner Weise überflüssig geworden. Ebenso kann die Beobachtungszeit (und häufige mikroskopische Untersuchungen) von Personen, die verdächtig sind, an Tripper zu leiden, auch bei öfterer Anwendung der Kultur nicht abgekürzt werden. Der negative Ausfall der Kultur besagt für die Erkennung des Trippers das gleiche wie ein negatives mikroskopisches Präparat. Daher kann das Kulturverfahren die mikroskopische Untersuchung nicht ersetzen (wie z. B. bei der Diphtherie), sondern stellt nur eine, wenn auch sehr wertvolle Ergänzung dar. Das Züchtungsverfahren nach Neumann ist ein wesentlicher Fortschritt in der kulturellen Diagnose der Gonorrhöe.

Zusammenfassung.

Nach einer Uebersicht über die Literatur wird zuerst die bakteriologische Diagnose der Gonokokken ausführlich besprochen. Besonders eingehend behandelt werden die Nährbodenfrage und die morphologischen und biologischen Eigenschaften der Gonokokken, deren Kenntnis zur Erkennung der Gonokokken in der Kultur notwendig ist. Weiterhin wird an Hand der Literatur und eigener Untersuchungen zu dem Züchtungsverfahren nach Neumann Stellung genommen. Der letzte Teil der Arbeit bringt einen Vergleich der kulturellen Diagnose des Trippers mit der mikroskopischen Untersuchung unter Berücksichtigung eigener Untersuchungen und der anderer Autoren.

Schrifttum.

1) Albrecht, Veroff. Heeressan.wes. **1938**, H. 105. — 2) Christiansen u. Becker, Münch. med. Wschr. **1938**, 990. — 3) Erler u. Schmitz, Arch. f. Dermat. **176**, 570 (1938). 4) Felke, Münch. med. Wschr. **1935**, 699. — Dermat. Wschr. **1938**, 110. — 5) Fischer u. Jordan, Klin. Wschr. **1931**, 259. — 6) Fröhlich u. Jordan, Med. Klin. **1932**, Nr 34. — 7) Gohring, Arch. f. Hyg. **108**, 307 (1932). — Ebenda **114**, 313 (1935). — 8) Gundel, Die Typenlehre in der Mikrobiologie. Jena, G. Fischer. — 9) Hämel, Klin. Wschr. **1932**, 1343. — 10) Jadassohn, Handb. d. Haut- u. Geschlechtskr., Bd. 20, I. — 11) Koch, Friedr. E., Zbl. Bakter. I Orig. **137**, 251 (1936). — 12) Konrad, Klin. Wschr. **1928**, 594. — 13) Krückeberg, Dermat. Wschr. **1937**, 1525. — 14) Lehmann-Neumann, Bakteriol. Diagnostik 1927. — 15) Mak, O., Chin. Soc. of Path. a. Microb. R., Zbl. Hautkrkh. **54**. 373 (1937). — 16) McLeod, Coates, Happold, Priestley a. Wheatley, J. of Path, **34**, 221 (1934). — 17) Neumann, Arch. f. Dermat. **173**, 393 (1936). — Dermat. Z. **75**, 125 (1937). — Dermat. Wschr. **1938**, 325. — 18) Schubert, Dermat. Z. **63**, 221 (1932). — Dermat. Wschr. **1932**, 386. — 19) Tauber, Wien. klin. Wschr. **1937**, Nr 23. — 20) Wendlberger u. Dolega, Dermat. Z. **75**, 8 (1937). — 21) Wezel, Münch. med. Wschr. **1938**, Nr 49. — 22) Winkler, Dermat. Wschr. **1937**, 845.

[Aus dem Institut für allgemeine Pathologie und Bakteriologie (Direktor: Prof. S. Belák) und aus der Urologischen Klinik der Pázmány Péter Universität (Direktor: Prof. G. Illyés, Budapest).]

Bakteriologische Typenuntersuchungen in histologischen Präparaten bei Nierentuberkulose.

Von Dr. **Eduard Gróh** und Dr. **T. Remete.**

In früheren Untersuchungen hat Gróh nachgewiesen, daß bei den verschiedenen Formen menschlicher Tuberkulose immer sowohl humane als auch bovine Bazillen als Erreger nachgewiesen werden können (1). In weiteren Untersuchungen haben wir 53 Fälle von Urogenitaltuberkulose studiert, wobei wir fanden, daß, während mit der im allgemeinen gebrauchten Technik bei diesen Formen menschlicher Tuberkulose bovine Bazillen nur in 43,4 Proz. nachgewiesen werden konnten, mit der von Gróh verwendeten Technik dies in 100 Proz. der Fälle gelang (2). Wir fanden aber den bovinen Typus niemals allein, sondern immer zusammen mit humanen Bazillen und zwar in verschiedenen Mengenverhältnissen zu letzteren, was zugleich zeigt, daß es bisher in keinem unserer Fälle gelang, einen reinen Typus als Erreger nachzuweisen. Es war daher weiteres Ziel unserer Untersuchungen, zu forschen, ob:

1. die beiden Typen, also der humane und der bovine, schon in den allerersten Stadien der Tuberkulose zugleich vorhanden sind, weiter ob
2. die beiden Typen innerhalb eines Herdes sind, ob
3. ein Zusammenhang zwischen der Schwere der Erkrankung und dem quantitativen Verhältnis der beiden Typen zueinander besteht.

Zu Untersuchungen dieser Art hielten wir die Nierentuberkulose für sehr geeignet, weil:

1. die aus dem Ureterkatheterharn gezüchteten Kulturen in ihren Eigenschaften mit den aus dem operativen Nierenmaterial gezüchteten Kulturen verglichen werden konnten.
2. weil wir in der tuberkulösen Niere die verschiedensten Stadien der Erkrankungen finden, vom frühesten Beginn bis zu den schwersten Zerfallserscheinungen (Kavernen).

Methodik.

Aus den tuberkulösen Herden der operativ entfernten Nieren wurde zuerst zur bakteriologischen Kultur Material entnommen und dann dieselbe Stelle zwecks histologischer Untersuchung ausgeschnitten und sofort verarbeitet.

Nährboden: Es wurde ein Eiernährboden verwendet, der 1½ Proz. Asparagin, 2½ Proz. Glyzerin und 1½ Proz. verkleisterte Kartoffelstärke enthielt, ohne Farbstoffzusatz. Ferner 4proz. Glyzerinbouillon und Sautonlösung.

Die erste Verimpfung erfolgte entweder mit frisch und steril entnommenem tuberkulösen Material oder einem solchen, welches vorher mit 25 Vol-proz. HCl-Lösung und nachfolgender Neutralisierung und Auswaschen vorbehandelt worden war.

Das histologische Untersuchungsmaterial wurde in der gewohnten Weise (Formalinfixierung, Methylbenzoat — Paraffineinbettung) verarbeitet und die Schnitte mit der Methode nach Ziel-Neelsen gefärbt.

Die Zahl der von uns untersuchten Fälle betrug 55 Nieren- und 1 Hodentuberkulose.

Die Züchtung der Kulturen aus den Herden erfolgte immer auf dem obenerwähnten ungefärbten Eiernährboden unter Beobachtung der Größe, Gestalt, Farbe, Wachstumsgeschwindigkeit der Kolonien und der inneren mikroskopischen Struktur der Stäbchen. Die zu untersuchenden Kolonien wurden einesteils auf Eiernährboden, anderenteils auf die erwähnten flüssigen Nährböden überimpft. Erhielten wir schon in der ersten Generation genügend Kolonien, so verwendeten wir diese zu den Tierversuchen. War dies nicht der Fall, so wurde die zweite Generation auf Eiernährboden hierzu verwendet. Von jedem Falle impften wir mindestens 3 Kaninchen und 3 Meerschweinchen; die Kaninchen wurden mit 1 cg Bazillen subkutan, die Meerschweinchen mit 1 mg Bazillen ebenso infiziert.

Entsprechend den tuberkulösen Veränderungen in den Nieren teilten wir unsere Ergebnisse in Gruppen ein und bringen diese in der nachstehenden Tabelle. Wir müssen hier erwähnen, daß wir oft in ein und derselben Niere die verschiedensten tuberkulösen Veränderungen fanden. So Tuberkel, Infarkte, Papillargeschwüre, tuberkulöse Abszesse bzw. Kavernen. In anderen Fällen war das Bild der tuberkulösen Veränderungen einförmiger und wir fanden dann in den exstirpierten Nieren entweder nur Kavernen oder nur Tuberkel (siehe folgende Tabelle).

Art der tuberkulosen Veränderung	Ergebnisse des bakteriologischen Kulturverfahrens					Ergebnisse der histologischen Typenbestimmung					
	Zahl der Fälle	vorwiegend hum.	vorwiegend bovine	humane u. bovine in gleicher Menge	negative Fälle	vorwiegend hum.	vorwiegend bovine	wenig Bazillen	nicht sauref. Stäbchen	humane u bovine in gleicher Menge	negative Fälle
Inhalt der Kavernen	63	10	22	2	29	—	—	—	—	—	—
Wand der Kavernen	44	6	14	17	7	8	12	9	4	4	7
Papillargeschwure .	16	3	9	3	1	5	4	—	2	5	—
Solitärtuberkel . .	11	4	5	—	2	4	5	—	—	—	2
Tuberkelkonglomerate	33	15	4	4	10	11	4	4	7	4	3
Infarkte	5	4	1	—	—	—	2	3	—	—	—
Pyelumtuberkulose .	6	1	2	3	—	1	2	—	3	—	—
Uretertuberkulose .	1	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1
Hodentuberkulose .	1	—	1	—	—	—	—	—	1	—	—
Degeneratio massiva	1	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1

Unsere Tabelle gliedert sich in zwei Teile: 1. in die kulturellen Ergebnisse der untersuchten Fälle, wobei als Kulturausgangsmaterial die genannten Herde dienten und 2. die Ergebnisse der morphologischen Typenbestimmung in den histologischen Schnitten aus den zum Kulturverfahren verwendeten Gewebsherde. Bei der histologischen Typenbestimmung erfolgte die Feststellung der Typenzugehörigkeit der Stäbchen in den nach Ziehl-Neelsen gefärbten Schnitten auf Grund der Stäbchenstruktur. Wir halten es für wichtig, zu erwähnen, daß die Ergebnisse dieser morphologischen Typenbestimmungen in allen Fällen mit den Ergebnissen des bakteriologischen

Züchtungsverfahrens übereinstimmen. Die in der Tabelle als „wenig Bazillen“ bezeichneten Fälle sind so zu verstehen, daß es auch bei stundenlangem Suchen nicht gelang, in den Schnitten soviele Stäbchen zu sichten, daß daraus eine sichere Bestimmung der Typenverteilung möglich gewesen wäre. In diesen Fällen fanden wir nur einige säurefeste humane und bovine Stäbchen, sehr oft neben einer Unzahl von anderen, nicht säurefesten Tuberkelbazillen, die wir natürlich bei der Typenbezeichnung in der Tabelle außer acht ließen. Die nicht säurefesten Tuberkelbazillen nahmen wir infolge ihrer schwachen Färbbarkeit oft nur kaum wahr, und bei einem großen Teil derselben war die Stäbchenkontur derart verwaschen, daß man ihre Anwesenheit nur mehr ahnen konnte. Bei diesen letzteren Stäbchen machten die in den blassen Stäbchen befindlichen, etwas stärker gefärbten Körnchen uns auf diese Bazillen aufmerksam. Es kam aber auch vor, daß nicht nur die Stäbchen, sondern auch die Körnchen ungefärbt waren. Betrachten wir nun die in der Tabelle angeführten einzelnen tuberkulösen Veränderungen.

Kavernen.

Den größten Teil unserer Untersuchungen bildeten die tuberkulösen Abszesse bzw. Kavernen. Ihre Zahl betrug 63, die wir in 36 verschiedenen Nieren fanden. Das Untersuchungsmaterial entnahmen wir auf zweierlei Art: entweder drangen wir mit einer Pasteurpipette durch die Abszeßwand in das Innere ein, so im Falle dünnen Kaverneninhaltes, oder wir eröffneten die Niere bzw. Kaverne, wenn deren Inhalt käsig oder sehr dickflüssig war. In letzterem Falle verimpften wir das Material mit der Platinöse auf den Eiernährboden. Die histologischen Untersuchungen erfolgten in der Wand der Kaverne, aus der wir in jedem Falle außerdem noch Kulturen anlegten. Unter diesen Umständen stellten wir fest, daß in allen Fällen, in denen der Herd bzw. der Kaverneninhalt sich zu erweichen begann, sowohl die Kulturen aus dem Kaverneninhalt und aus der Kavernenwand als auch die histologischen Schnitte aus der Kavernenwand morphologisch dieselbe Bazillentypenverteilung zeigten. In diesen Fällen fanden wir neben humanen in großer Anzahl bovine Bazillen, die sich nicht nur kulturell, sondern auch im Tierversuch als bovine erwiesen. Bei den histologischen Untersuchungen waren wir bemüht, das zahlenmäßige Verhältnis zwischen den humanen und den bovinen Bazillen in den einzelnen Schnitten festzustellen. Wir fanden dabei, daß das Verhältnis der beiden Typen zueinander wechselweise etwa 30—70 Proz. betrug, d. h., daß sowohl die humanen wie die bovinen Bazillen in den erweichenden Herden niemals weniger als etwa 30 Proz. und niemals mehr als etwa 70 Proz. ausmachen. Andere Ergebnisse erhielten wir, wenn der Kaverneninhalt flüssig war. Je flüssiger nämlich der Inhalt der Kavernen war, desto mehr humane Bazillen fanden wir in den aus dem Kaverneninhalt gezüchteten Kulturen im Verhältnis zu den bovinen. So gab es Kavernen, aus deren Inhalt wir bei der Züchtung Kulturen mit humanem Charakter mit fast nur humanen Stäbchen erhielten. In diesen Fällen waren die Kulturen aus der Kavernenwand bovinen Charakters und enthielten fast ausschließlich bovine Stäbchen. Dieser Gegensatz zwischen Kavernenwand und Kaverneninhalt bezüglich des Typus der darin gefundenen Stäbchen war uns vollkommen unverständlich. Daher bemühten wir uns sorgfältig, diesen Umstand zu klären. Bei unseren histologischen Untersuchungen war uns aufgefallen, daß an sehr vielen Stellen isoliert nur zellige Infiltration gefunden wurde, aber kein Tuberkel. Bei sorgfältiger Untersuchung dieser oft sehr ausgedehnten zelligen Infiltrationen fiel uns auf, daß in diesen gewöhnlich keine säurefesten Bazillen zu sehen waren, sondern nur Gruppen aus Körnchen und nicht säurefesten

Stäbchen. Von diesen Gruppen stellten wir aber fest, daß sie eigentlich bovine Bazillen seien und die Körnchen zumeist nicht frei, sondern ın ungefärbten Stäbchen liegen. Diese größeren oder kleineren Gruppen von Körnchen und nicht säurefesten Stäbchen waren aber niemals in Blutgefäßwänden zu finden, und wir fanden in diesen Gruppen niemals humane Bazillen. Auf Grund dessen mußten wir also annehmen, daß diese Gruppen von nicht säurefesten bovinen Bazillen nicht als Gruppen an diese Stellen gelangten, sondern das Vermehrungsprodukt einzelner dorthin gelangter Bazillen darstellen. Im Verlaufe der Vermehrung dieser Bazillen kam wahrscheinlich auch die zellige Infiltration zustande und infolge der phagozytären Tätigkeit der umgebenden Zellen sowie anderer immunbiologischer Umstände verloren diese bovinen Bazillen ihre Säurefestigkeit und vielleicht auch ihre Lebensfähigkeit. Unsere diesbezügliche Annahme wird auch durch die Beobachtung unterstützt, daß wir oft in Leukozyten solche wenig oder nicht säurefeste Stäbchen fanden. Die erwähnten Bazillengruppen befanden sich in den zelligen Infiltrationen zwischen gut gefärbten und gut konturierten Zellen mit erhaltenem Kern, was dafür spricht, daß diese Bazillen als solche und ihre Stoffwechselprodukte nicht fähig sind, die Gewebszellen ernstlich zu schädigen, so daß sie zugrunde gehen. Gerade das Fehlen der Zellen- bzw. Gewebsnekrose erklärt aber auch das Fehlen einer Proliferation in diesem Falle, und so wird es erklärlich, warum diese Gruppen von bovinen Bazillen niemals zur Tuberkelbildung führen. Dieser Umstand zeigt, daß die bovinen Bazillen im menschlichen Organismus sich zwar vermehren, aber nur geringe Gewebsreaktionen hervorrufen (zellige Infiltration), um dann unter Einwirkung der umgebenden Körperzellen zugrunde zu gehen. Aehnlich liegen die Verhältnisse im tuberkulösen Abszeßeiter, in welchem wir neben säurefesten humanen zahlreiche nicht säurefeste, im Zugrundegehen begriffene, bovine Bazillen finden. Der Umstand, daß in den aus dem Abszeßeiter gewonnenen vorwiegend humanen Kulturen immer auch wenige bovine Stäbchen zu finden sind, spricht dafür, daß in dem Eiter einige bovine Bazillen ihre Lebens- und Vermehrungsfähigkeit behalten haben. In unserer früheren Arbeit über die Muchschen Granula (3) aber haben wir schon berichtet, daß die Wirkung des Eiters nicht bei den bovinen Stäbchen Halt macht, sondern früher oder später auch die scheinbar resistenteren humanen Bazillen angreift, wodurch auch diese ihre Säurefestigkeit und später Lebensfähigkeit verlieren. Der Eiter aus solchen Abszessen ist dann für keine Tierart mehr pathogen, und es lassen sich aus demselben keine Kulturen züchten. Im Verlaufe unserer Untersuchungen fanden wir in den Nieren 29 solche sterile Abszesse.

Bei Untersuchung der Wand der erwähnten 29 Abszesse fanden wir mit Ausnahme von sieben in histologischen Schnitten in der Wand des Abszesses noch säurefeste Stäbchen. Abgesehen von diesen 7 Fällen konnten wir in den übrigen 22 Fällen auch tatsächlich Kulturen aus der Kavernenwand herauszüchten. Bei Untersuchung dieser Kulturen auf Typen fanden wir verschiedene Abstufungen. Je mehr die Wandnekrose fortgeschritten war, desto weniger säurefeste bovine Bazillen waren sowohl in den histologischen Präparaten zu finden als auch in den Kulturen nachzuweisen. Unsere kulturellen Untersuchungen stützten wir dann mit dem Tierversuche. Bei Prüfung der Abszeßwand gegen das gesunde Gewebe zu fanden wir nur zellige Infiltration mit vereinzelten säurefesten oder in Gruppen liegenden, nicht säurefesten bovinen Bazillen.

Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß die Verkäsung und Kolliquation nur bei Vorhandensein einer gewissen Anzahl (etwa 30—70 Proz.) boviner Bazillen zustande kommen kann, und wir halten es für wahrscheinlich,

daß die Verkäsung nicht durch die beim Zerfall der Leukozyten freiwerdenden unbekannten Wirkungsstoffe (Enzyme) hervorgerufen wird (4), sondern durch Stoffwechselprodukte der Tuberkelbazillen, die auftreten, wenn humane und bovine Bazillen in einem gewissen Mengenverhältnis zueinander vorhanden sind. Die Kolliquation ist dann bereits eine Folge leukozytärer Tätigkeit.

Papillare Geschwüre.

Die Zahl der diesbezüglichen Fälle beträgt 16 und mit Ausnahme eines erhielten wir in 15 Fällen Kulturen. In 9 Fällen war der Charakter der Kulturen auf Grund ihres Wachstums als bovin zu bezeichnen, und diese Stämme waren für Kaninchen pathogen. 3 Stämme zeigten in der Kultur humanes Gepräge, waren aber für Kaninchen ebenfalls pathogen. Die mikroskopische Untersuchung dieser Stämme aber zeigte, daß in jedem von ihnen eine beträchtliche Anzahl boviner Bazillen vorhanden war, so daß ihre Pathogenität für Kaninchen damit erklärt ist. Bei den histologischen Untersuchungen sahen wir in 3 papillären Geschwüren die bovinen Bazillen in riesig großen, aber ganz getrennt stehenden Gruppen, zwischen denen einzelne kleinere Gruppen humaner Bazillen standen. Dieser Befund ist ein wichtiger Beweis dafür, daß die humanen Stäbchen sich nicht in bovine verwandeln und sowohl die humanen als auch die bovinen Bazillen ihren eigenen Entwicklungsgang nebeneinander, aber getrennt verfolgen und darum in getrennt liegenden Gruppen zu finden sind. Daß wir zwischen großen Gruppen von bovinen Stäbchen nur kleine Gruppen von humanen fanden, obwohl es allgemein bekannt ist, daß die humanen Bazillen sich viel schneller vermehren als die bovinen, zeigt, daß die Entwicklung dieser humanen Bazillen gehemmt ist, und zwar durch die gleichzeitig in überwiegender Anzahl vorhandenen bovinen, eine Erscheinung, auf die einer von uns bereits in seiner früheren Arbeit hinwies (5). Ohne diese Annahme einer Wachstumshemmung wäre es nicht erklärlich, warum die Gruppen der in Kulturen viel langsamer wachsenden bovinen um so vieles größer sind als die der humanen. In den histologischen Schnitten fanden wir die bovinen Bazillen sowohl in den Wänden der papillaren Geschwüre wie in denen der Kavernen immer im abgestorbenen Gewebe und niemals in dem dieses bedeckenden Eiter. In diesem fanden wir höchstens nicht säurefeste Stäbchen mit verwaschenen Konturen. Gegen das gesunde Gewebe zu nahm die Säurefestigkeit der Stäbchen allmählich ab, ja sie hörte sogar ganz auf. Diese nichtsäurefesten Bazillen waren aber niemals humane. Das Bild war also dasselbe, wie wir es bei der Abszeßwand der Kaverne gesehen hatten, und deshalb müssen auch die papillären Geschwüre als kleinere, zerfallene tuberkulöse Abszesse betrachtet werden, bei deren Entstehung die bovinen Bazillen eine ebenso große Rolle spielen wie bei der Entstehung einer Kaverne. Im allgemeinen betrachten die Forscher aber die papillären Geschwüre als die erste Station der Nierentuberkulose (6). Nach dem Gesagten ist es also offensichtlich, daß die bovinen Bazillen der späteren Erkrankung den Weg bereiten, die dann nur beim Uebergreifen von humanen Bazillen zum Ausbruch kommt.

Tuberkel.

Die Zahl der von uns untersuchten diesbezüglichen Fälle beträgt 11, die makroskopisch isoliert und von verschiedener Größe (Hirse- bis Hanfkorngröße) waren. Außer diesen untersuchten wir noch 33 Fälle von aus kleineren und größeren Tuberkeln zusammengesetzten sogenannten Tuberkelkonglomeraten. Von diesen 44 Tuberkeln erhielten wir in 12 Fällen keine

Kulturen. Unter den verbleibenden 32 Fällen gelangten wir in 19 Fällen zu Stämmen, die sich sowohl beim kulturellen Züchtungsverfahren als auch im Tierversuch als typisch humane Stämme erwiesen. In all diesen Stämmen aber fanden wir, wenn auch natürlich in der Minderzahl, immer vereinzelte bovine Stäbchen. 9 Stämme erwiesen sich kulturell und im Tierversuch als bovin, und jeden dieser gewannen wir aus käsig erweichten Tuberkeln; diese Tuberkulome waren also eigentlich kleinere tuberkulöse Abszesse. In 4 Fällen waren die Kulturen unserer Stämme atypisch, sie wuchsen in den Kulturen eugonisch, waren für Kaninchen pathogen, was mit dem zahlreichen Vorhandensein boviner Stäbchen in den Kulturen im Einklang steht.

Histologische Untersuchungen. Abgesehen von den im Erweichen begriffenen Tuberkeln fanden wir in keinem der histologischen Präparate in größerer Zahl bovine Bazillen[1]). In 7 Fällen fanden wir ausschließlich nicht säurefeste Bazillen, in 5 Fällen wieder konnten in den Schnitten überhaupt keine Bazillen gefunden werden. In keinem der histologischen Präparate fanden wir in den Tuberkeln ausschließlich bovine Bazillen, ja auf jedes der wenigen bovinen Stäbchen kamen immer bedeutend mehr humane Bazillen. Hingegen gab es Tuberkel, in denen zwar sehr wenige, aber ausschließlich humane Stäbchen vorhanden waren; das Zentrum solcher Tuberkel zeigte bereits Nekrose, in welcher wir manchmal verwaschene, nicht säurefeste Stäbchen erblickten, die in günstigen Fällen ihrer Struktur nach als gewesene bovine Bazillen angesprochen werden konnten.

Ziehen wir all dies in Betracht, so sind wir geneigt anzunehmen, daß Tuberkel nur dann entstehen, wenn beide Typen des Tuberkuloseerregers zugleich in den erkrankten Organen vorkommen. Da wir nämlich in den Präparaten niemals mit voller Sicherheit ausschließlich nur humane Bazillen finden konnten, so wären wir geneigt, als künftige Arbeitshypothese anzunehmen, daß auf die Wirkung humaner Bazillen allein Tuberkel niemals entstehen.

Infarkte.

Die Zahl unserer diesbezüglich untersuchten Fälle beträgt 5. In 4 Fällen erhielten wir atypische Kulturen, die anfänglich eher bovinen Charakter trugen, im Verlaufe der weiteren Züchtung aber immer mehr humanes Gepräge annahmen. Diese Kulturen waren für Kaninchen in geringerem Maße pathogen, nach einigen Generationen verloren sie diese fast vollständig. Mikroskopisch fanden wir in diesen Kulturen in den ersten Generationen etwa 20 Proz. bovine Stäbchen, die sich in den folgenden Generationen allmählich fast verloren. Daß aber diese 20 Proz. tatsächlich bovine Stäbchen waren, konnten wir durch Kaninchenpassage und Kulturversuche beweisen. Einer der Infarktstämme hatte ausgesprochen bovinen Charakter. In den histologischen Präparaten der Infarktfälle sahen wir zellige Infiltration mit säurefesten und nicht säurefesten Stäbchen, weiterhin zerstreut kleinere und größere Tuberkel mit Riesenzellen, in welchen wir häufig paarige Stäbchen fanden, von denen wir nicht selten feststellten, daß das eine human, das andere bovin war. Diese Tuberkel fanden wir hauptsächlich neben den zelligen Infiltrationen. In zwei von den Infarktfällen waren verhältnismäßig zahlreiche bovine Bazillen im Gewebe, die aber nicht alle säurefest waren. Neben den säurefesten bovinen Stäbchen fanden wir in diesen Schnitten auch vereinzelte humane; die beiden Bazillentypen waren zwischen den Epithelzellen verstreut, um sie herum sehr starke Infiltration, Exsudation und Proliferation.

---

1) Wir bemerken, daß wir in den Präparaten viele hunderte mikroskopische Tuberkel fanden und auch die makroskopisch solitären Tuberkel aus kleineren Tuberkeln entstanden.

Pyelumtuberkulose.

Wir untersuchten 6 diesbezügliche Fälle. In einem dieser erhielten wir Kulturen mit ausgesprochen humanem Charakter, in denen auch mikroskopisch die humanen Bazillen in deutlicher Mehrzahl waren, in zwei Fällen bovine Kulturen, in drei Fällen wieder erhielten wir atypische Kulturen mit eher humanem Charakter, die aber im Tierversuch für Kaninchen pathogen waren. Mikroskopisch waren in den letzteren humane und bovine Bazillen in ungefähr gleicher Anzahl vorhanden. Nach dem Gesagten konnten auch die histologischen Schnitte keine Ueberraschungen bieten, weil wir z. B. in einem Falle bovine Bazillen in überwiegender Mehrzahl fanden, aber im abgestorbenen Zelldetritus.

Uretertuberkulose.

In einem Falle fanden wir im verschlossenen Ureter (der einer tuberkulösen Niere angehörte), eine dicke, weißlich-gelbliche rahmartige Masse, in der Bazillen weder mikroskopisch noch auf kulturellem Wege nachgewiesen werden konnten. In den histologischen Schnitten fanden wir ebenfalls keine säurefesten Bazillen, sondern nur Zelltrümmer und Stäbchen mit vollkommen verwaschenen Konturen. Ein ganz ähnliches Bild wie dieses fanden wir einmal auch in einer Niere, wobei fast die ganze Niere aus derartigen zerfallenden Abszessen bestand, die von den Klinikern als Degeneratio massiva bezeichnet wurde.

Hodentuberkulose.

In einem Falle nahmen wir die histologische Untersuchung vor, wobei die Befunde vollkommen mit dem bisher Gesagten übereinstimmten.

Zusammenfassung.

Es wurden 55 Nieren- und 1 Hodentuberkulose auf das gleichzeitige Vorkommen und gegenseitige Mengenverhältnis von humanen und bovinen Bazillen kulturell und histologisch untersucht. Wir fanden, daß die bovinen Bazillen allein nur eine zellige Infiltration hervorrufen, bald aber ihre Säurefestigkeit und später auch die Lebensfähigkeit verlieren. Bovine Bazillen konnten niemals als alleinige Erreger von Tuberkeln festgestellt werden. Wir kommen aber auf Grund der Untersuchungen zu der Ansicht, daß auch die humanen Bazillen allein niemals die Bildung eines Tuberkels auslösen können. In jedem Tuberkel fanden sich beide Erregertypen zugleich, aber fallweise in einem verschiedenen quantitativen Verhältnis. Betrug das Mengenverhältnis der beiden Typen wechselweise etwa 30—70 Proz., so kam es zur käsigen Erweichung der Herde. Auf Grund dieser Beobachtungen im Zusammenhange mit unseren früheren Ergebnissen kommen wir zum Schlusse, daß die bovinen Bazillen bei Entstehung und Verlauf der menschlichen Urogenitaltuberkulose eine wichtige Rolle spielen.

Schrifttum.

1) Gróh, E., Z. Tbk. **74** (1936). — 2) Gróh, E., u. Remete, T., Zbl. Bakter. I Orig. **143** (1939). — 3) Gróh, E., Zbl. Bakter. I Orig. **139** (1937). — 4) Tendeloo, N. Ph., Path. Anatomie. Brauer-Schröder-Blumenfeld, Handb. d. Tbk., Bd. I, 1914. — 5) Gróh, E., Z. Hyg. **122** (1939). — 6) Lieberthal, F., a. Huth, Th., Surg. Gynecol. a. Obstet. **60** (1932).

[Aus der Pockenabteilung des Instituts Robert Koch
(Abteilungsdirektor: Prof. H. A. Gins).]

Aerobes Wachstum von anaeroben Zahnbakterien.

Von A. Illényi.

Die Trichobakterien, zu denen man auch die Leptothrix rechnet, sind die größte, aber wenig erforschte Gruppe der Bakterien der Mundhöhle. Sie sind nach früheren Anschauungen charakterisiert durch große Variabilität und große Anpassungsfähigkeit an gesundes und krankes Gewebe [Huntemüller (1)]. Durch die Entdeckung und Reinzüchtung einer großen Gruppe von streng anaerob wachsenden, nicht versporenden Mikroben in der menschlichen Mundhöhle ist es Gins (2) in den letzten 10 Jahren gelungen, ganz andere und tiefere Einblicke in die Zusammensetzung und Verteilung der Mundhöhlenflora zu tun. Auf Grund seiner Erfahrungen läßt sich diese Flora in zwei Gruppen aufteilen, deren Trennung an und im Zahn jetzt schon befriedigend gelingt. — Ein Teil der am Zahn nachweisbaren Flora kann als „Durchgangsflora" betrachtet werden, ein anderer als „Standortflora". Die erstere besteht vorwiegend aus denjenigen Keimen, die mit der Nahrung in die Mundhöhle gelangen. Die Standortflora hat augenscheinlich eine ganz andere Genese. Sie besteht vorwiegend aus streng anaeroben Keimen aus den Gruppen der Fadenbakterien, Spirillen, fusiformen Bazillen usw. Im Jahre 1936 wurden sechs genau durchuntersuchte Fälle beschrieben [Gins (3)], bei welchen an der pathogenen Bedeutung der anaeroben Leptothricheen nicht mehr gezweifelt werden konnte. Sie war damals schon durch den Nachweis spezifischer Agglutinine im Patientenserum und durch die erfolgreiche Anwendung von Autovakzinen aus anaeroben Leptothrixkulturen gestützt.

Nach zahlreichen Vorarbeiten trat die Karies mehr in den Vordergrund der Bearbeitung. Zu Anfang des Jahres 1937 wurde [Gins (4)] über die eingehende bakteriologische Analyse einer Reihe von Kariesfällen berichtet und darauf hingewiesen, daß die anaeroben Mundbakterien in dieser Kariesflora die Hauptrolle spielen.

Im folgenden möchte ich mich mit dem biologischen Verhalten dieser Mundbakterien beschäftigen. Es ist bekannt, daß es im Munde gute aerobe Verhältnisse gibt, und es steht außer Zweifel, daß die von Gins beschriebene „Standortflora" anaerob ist. Fraglich ist nur, wie wir diese beiden Tatsachen miteinander in Einklang bringen können. Sind solche Stoffe bekannt, die die Anaeroben zu Aeroben machen? Können wir diese im menschlichen Organismus finden? Können wir einen solchen Nährboden künstlich herstellen, der im Organismus aus den vorhandenen Stoffen entsteht und der trotzdem zur aeroben Züchtung der Anaeroben geeignet ist?

Bei der Lösung der Frage hatte ich die Vorstellung, daß das im menschlichen Organismus vorhandene Vitamin C oder die von den Bakterien ge-

schaffenen Stoffwechselprodukte — die nach Berencsi-Illényi (5) mit großer Wahrscheinlichkeit das Vitamin C enthalten — dazu fähig sind, daß sie die streng anaeroben Stämme zu aeroben machen. Seit den Untersuchungen von Ehrismann (6) kennen wir die Rolle des Vitamins C bei den sporenbildenden Anaeroben, die wir uns nach dem Verfasser auf der Grundlage der Reduktion vorstellen müssen. Ueber die Steigerung des von den Bakterien geschaffenen empfindlichen Oxydations-Reduktionssystem berichten meine mit Berencsi (7) durchgeführten Versuche. — Die Kenntnis derselben machte die Lösbarkeit des Problems wahrscheinlich, und zwar mit Hilfe des Vitamins C oder der Stoffwechselprodukte der Bakterien. Das nahm ich um so mehr an, weil die Untersuchungen von Büsing-Illényi (8) gezeigt hatten, daß durch das Filtrat von Bac. prodigiosus die sporenbildenden anaeroben Stämme zu aeroben gemacht werden können.

Die Versuche habe ich so durchgeführt, daß ich einige Anaerobier in flüssigem Nährboden auf aerobe Weise gezüchtet habe. Ich habe vorläufig mit zwei Stämmen gearbeitet, und zwar mit Leptothrix tenuis (früher Gins XIX) und mit einem Fusiformis-Stamm, der aus meiner eigenen Mundflora stammte. Auf der Fortner-Platte wuchsen beide Stämme innerhalb von 48 Std. gut, auf der aeroben Platte jedoch nicht. Zu den Versuchen verwandte ich kristallisiertes C-Vitamin, das ich teils in Kristallform, teils in gelöstem Zustande dem Kulturmedium beigefügt habe. Das Prodigiosusfiltrat habe ich so hergestellt, daß ich in 2proz. Xylosebouillon den Bac. prodigiosus 4—16 Tage im Thermostat gezüchtet habe. Die Bakterien habe ich durch Filtrierung durch Berkefeld-Filter entfernt, und das so gewonnene kristallklare Filtrat habe ich sogleich benutzt. Von den Stämmen wissen wir, daß sie in gewöhnlicher Bouillon sich nicht züchten lassen und in Leberbouillon nur dann, wenn wir sie mit Vaselin abschließen.

Tabelle I.

Datum: 2. 5. 39	1	2	3	4	5	6	Bemerkung
	Ster. pr. Vitamin C Leberbouillon mit Vaselin	Ster. pr. Vitamin C Bouillon	Vitamin C Lept. ten. Leberbouillon ohne Vaselin	Vitamin C Lept. ten. Leberbouillon mit Vaselin	Ohne Vit. Lept. ten. Leberbouillon ohne Vaselin	Ohne Vit. Lept. ten. Leberbouillon mit Vaselin	
5. 5. 39	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	mikroskopische Untersuchung
8. 5. 39	negativ	negativ	positiv	positiv	negativ	negativ	
12. 5. 39	negativ	negativ	negativ	positiv	negativ	negativ	Wachstumsprufung auf Fortner-Platte

Zuerst habe ich den Versuch unternommen, ob diese Stämme in gewöhnlicher Bouillon unter Hinzufügung von C-Vitamin ähnlich den sporenbildenden Anaeroben zu züchten wären. Diese meine Versuche haben ein völlig negatives Ergebnis gehabt. — Ich bin weitergegangen und habe den Versuch mit Leberbouillon unter Hinzufügung von C-Vitamin unternommen. Meine Ergebnisse waren die folgenden (Tabelle I). Wie aus der Tabelle hervorgeht, konnte ich Leptothrix tenuis mikroskopisch im Nährboden nachweisen, aber sie weiterzuzüchten gelang mir nicht. Dafür gibt es meiner Auffassung nach zwei Gründe: entweder war der Nährboden, den ich benutzte, nicht geeignet oder die Vitaminmenge, die ich hinzufügte, war zu gering. Ich wandte nun Aszitesbouillon an und zog auch den anderen Stamm zum Vergleich heran (Tabelle II). — Wie aus der Tabelle hervorgeht, ist mir

Tabelle II.

Datum: 2. 5. 39	1 Ster. pr. Aszites-bouillon	2 Ster. pr. Aszites-bouillon mit Vaselin	3 Vitamin C Lept. tenuis Aszites-bouillon ohne Vaselin	4 Vitamin C Lept. tenuis Aszites-bouillon mit Vaselin	5 Ohne Vit. Lept. tenuis Aszites-bouillon ohne Vaselin	6 Ohne Vit. Lept. tenuis Aszites-bouillon mit Vaselin	7 Vitamin C Fusiformis Aszites-bouillon ohne Vaselin	8 Vitamin C Fusiformis Aszites-bouillon mit Vaselin	9 Ohne Vit. Fusiformis Aszites-bouillon ohne Vaselin	10 Ohne Vit. Fusiformis Aszites-bouillon mit Vaselin	Bemerkung
5. 5. 39	negativ	negativ	positiv	positiv	negativ	negativ	positiv	positiv	negativ	negativ	mikroskopische Untersuchung
8. 5. 39	negativ	negativ	positiv	positiv	negativ	negativ	positiv	positiv	negativ	negativ	mikroskopische Untersuchung
12. 5. 39	negativ	negativ	negativ	positiv	negativ	negativ	positiv	positiv	negativ	negativ	Wachstumsprufung auf Fortner-Platte

Tabelle III a.

Datum: 9. 5. 39	1 Ohne Vitamin Aszites-bouillon Lept. tenuis	2 Mit Vitamin gewohnliche Bouillon Lept. tenuis	3 0,1 mg Vitamin C Lept. tenuis Aszites-bouillon	4 0,5 mg Vitamin C Lept. tenuis Aszites-bouillon	5 1,0 mg Vitamin C Lept. tenuis Aszites-bouillon	6 1,5 mg Vitamin C Lept. tenuis Aszites-bouillon	7 2,0 mg Vitamin C Lept. tenuis Aszites-bouillon	8 3,0 mg Vitamin C Lept. tenuis Aszites-bouillon	9 4,0 mg Vitamin C Lept. tenuis Aszites-bouillon	Bemerkung
13. 5. 39	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	mikroskopische Untersuchung
15. 5. 39	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	mikroskopische Untersuchung

Tabelle III b.

Datum: 9. 5. 39	1 Ohne Vitamin Aszites-bouillon Fusiformis	2 Mit Vitamin gewohnliche Bouillon Fusiformis	3 0,1 mg Vitamin C Fusiformis Aszites-bouillon	4 0,5 mg Vitamin C Fusiformis Aszites-bouillon	5 1,0 mg Vitamin C Fusiformis Aszites-bouillon	6 1,5 mg Vitamin C Fusiformis Aszites-bouillon	7 2,0 mg Vitamin C Fusiformis Aszites-bouillon	8 3,0 mg Vitamin C Fusiformis Aszites-bouillon	9 4,0 mg Vitamin C Fusiformis Aszites-bouillon	Bemerkung
13. 5. 39	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	mikroskopische Untersuchung
15. 5. 39	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	mikroskopische Untersuchung

mit Fusiformis die Weiterzüchtung des Stammes auf der Fortner-Platte gelungen, aber mit Leptothrix tenuis gelang mir dies wiederum nicht. Danach habe ich eine gesteigerte Quantität Vitamin C meinen Versuchen beigefügt, und zwar zuerst in Aszitesbouillon. Wie Tabelle III a und III b zeigen, bewegt sich bei Fusiformis die Vitaminmenge, die zur Züchtung unbedingt notwendig ist, zwischen 0,5—1,5 mg, während bei Leptothrix tenuis in Aszitesnährboden auch mit höherer C-Vitaminquantität ein Ergebnis nicht zu erreichen war.

Tabelle III c.

Datum: 3. 5. 39	1	2	3	4	5	6	Bemerkung
	Kontrolle ohne Vitamin Lept. ten. Leber-bouillon	0,1 mg Vitamin C Lept. ten. Leber-bouillon ohne Vaselin	0,5 mg Vitamin C Lept. ten. Leber-bouillon ohne Vaselin	2,0 mg Vitamin C Lept. ten. Leber-bouillon ohne Vaselin	4,0 mg Vitamin C Lept. ten. Leber-bouillon ohne Vaselin	5,0 mg Vitamin C Lept. ten. Leber-bouillon ohne Vaselin	
8. 5. 39	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	mikrosk. Unters.
12. 5. 39	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	Wachstumsprüf. a. Fortner-Platte

Danach bin ich wieder zu dem Nährboden zurückgekehrt, der mehr Erfolg versprach, und zwar zur Leberbouillon (Tabelle III c). Wie aus der Tabelle hervorgeht, muß man hierbei 4 mg C-Vitamin hinzufügen, um Leptothrix tenuis züchtbar zu machen. So scheint es außer Zweifel zu stehen, daß die Züchtung der Stämme mit Hilfe von C-Vitamin auch unter aeroben Bedingungen möglich ist, und ferner weisen diese Versuche darauf hin, daß wir unter den Stämmen vom Gesichtspunkt der Züchtung bisher nicht bekannte Unterschiede machen können. Während der Fusiformis nur unter Hinzufügung einer verhältnismäßig kleinen Menge von C-Vitamin in Aszitesbouillon unter aeroben Bedingungen gezüchtet werden kann, entwickelt sich Leptothrix tenuis nur in Leberbouillon und unter Beifügung einer verhältnismäßig großen Menge von C-Vitamin.

Eine weitere Frage war, ob die Versuche bei Beifügung von Stoffwechselprodukten der Bakterien wiederholt werden können. Zu diesem Zweck habe ich die Stoffwechselprodukte des Bac. prodigiosus benutzt (Tabelle IV u. V). Wie die Tabellen zeigen, entwickelt sich der Bac. fusiformis in Aszitesnährboden mit Filtrat recht gut, dagegen wächst Leptothrix tenuis nicht. Diese Leptothrix kann nur in Leberbouillon mit Filtrat gezüchtet werden. Aus diesem Versuch geht also hervor, daß das Filtrat der Kultur von Bac. prodigiosus im biologischen Sinne Vitamin C ersetzen kann.

Tabelle IV.

Datum: 10. 5. 39	1	2	3	4	5	Bemerkung
	Kontrolle Filtrat Leber-bouillon	3,0 ccm Filtrat Lept. tenuis Leberbouill.	Ohne Filtrat Lept. tenuis Leberbouill.	3,0 ccm Filtrat Fusiformis Leberbouill.	Ohne Filtrat Fusiformis Leberbouill.	
15. 5. 39	negativ	positiv	negativ?	positiv	negativ?	mikrosk. Unters.
19. 5. 39	negativ	positiv	positiv [1]	positiv	positiv [1]	Wachstumsprüf. auf Fortner-Platte

1) Vermehrung zweifelhaft, vielleicht überlebende Einsaat.

Tabelle V.

Datum: 10. 5. 39	1 Kontrolle Aszites Bouillon	2 Kontrolle Filtrat Bouillon	3 mit Aszites mit Filtrat Lept. tenuis Bouillon	4 mit Aszites ohne Filtrat Lept. tenuis Bouillon	5 ohne Aszites mit Filtrat Lept. tenuis Bouillon	6 ohne Aszites ohne Filtrat Lept. tenuis Bouillon
15. 5. 39	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
19. 5. 39	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ

Datum: 10. 5. 39	7 mit Aszites mit Filtrat Fusiformis Bouillon	8 mit Aszites ohne Filtrat Fusiformis Bouillon	9 ohne Aszites mit Filtrat Fusiformis Bouillon	10 ohne Aszites ohne Filtrat Fusiformis Bouillon	Bemerkung
15. 5. 39	positiv	positiv	positiv	positiv [1])	mikroskop. Untersuchung
19. 5. 39	positiv	positiv	positiv	positiv	Wachstumsprüfung auf Fortner-Platte

1) Wachstum zweifelhaft, vielleicht überlebende Einsaat.

Danach war es mein Bestreben, festzustellen, bei welchen quantitativen Verhältnissen dieser Ersatz gelingt. Mit einer vierzehntägigen Kultur von Bac. prodigiosus habe ich die Titrierung durchgeführt, ähnlich den Versuchen mit Vitamin C (Tabelle VI a und VI b). — Wie aus der Tabelle hervorgeht, genügt das Filtrat 1,0 ccm sowohl bei dem Fusiformis als auch bei Leptothrix tenuis dazu, die aerobe Züchtung zu ermöglichen. Diese Erscheinung beweist, daß das Filtrat der Prodigiosus-Kultur für die aerobe Züchtung ein ebenso brauchbares Medium ist wie das kristallisierte C-Vitamin. Die bei Tillmans nachweisbare Menge ist bedeutend geringer als die, die hier den quantitativen Verhältnissen des Ersatzes entsprechen würde, was uns folgern läßt, daß wir vielleicht auch an das

Tabelle VI a.

Datum: 17. 5. 39	1 Kontrolle Filtrat Leberbouillon	2 1,0 ccm Filtrat Leberbouillon Lept. tenuis	3 3,0 ccm Filtrat Leberbouillon Lept. tenuis	4 5,0 ccm Filtrat Leberbouillon Lept. tenuis	Bemerkung
20. 5. 39	negativ	positiv	positiv	positiv	mikroskop. Untersuch.
22. 5. 39	negativ	positiv	positiv	positiv	Wachstumsprüfung auf Fortner-Platte

Tabelle VI b.

Datum: 17. 5. 39	1 Kontrolle Aszites-bouillon	2 0,5 ccm Filtrat Aszites-bouillon	3 1,0 ccm Filtrat Aszites-bouillon Fusiformis	4 2,0 ccm Filtrat Aszites-bouillon Fusiformis	5 3,0 ccm Filtrat Aszites-bouillon Fusiformis	6 4,0 ccm Filtrat Aszites-bouillon Fusiformis	7 5,0 ccm Filtrat Aszites-bouillon Fusiformis	Bemerkung
20. 5. 39	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	mikrosk. Unters.
22. 5. 39	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	Wachstumspruf. a. Fortner-Platte

Vorhandensein anderer biologisch aktiver Stoffe im Filtrat von Bac. prodigiosus außer dem C-Vitamin denken müssen.

Noch auf eine weitere Frage wollte ich im Zusammenhang mit diesen Versuchen eine Antwort erhalten, und zwar darauf, welche chemischen Stoffe zur Züchtung außer dem C-Vitamin noch notwendig sind. Bezüglich des Fusiformis war es ganz offenbar, daß außer NaCl, Pepton und Vitamin C noch Bouilloneiweiß und menschliches Eiweiß der Züchtung beigefügt werden muß. Zur Züchtung von Leptothrix tenuis ist dieser Nährboden aber noch nicht geeignet, sondern wir müssen — wie wir das gesehen haben — Leberbouillon hinzunehmen. Ich habe es für wahrscheinlich gehalten, daß das in der Leber enthaltene Glykogen hier eine Rolle spielen kann, deshalb habe ich dann bei meinen weiteren Untersuchungen glykogenhaltige Nährböden benutzt (Tabelle VII). Aus der Tabelle kann festgestellt werden, daß beim Vorhandensein gewisser Glykogenquantitäten das Wachstum von Leptothrix tenuis auch unter aeroben Verhältnissen einsetzt.

Tabelle VII.

	1	2	3	4	5	6
Datum: 2. 6. 39	Kontrolle Glykogen Bouillon	Kontrolle Filtrat Bouillon	Glykogen[1] 1,0 ccm Filtrat Lept. tenuis Bouillon	Glykogen 1,5 ccm Filtrat Lept. tenuis Bouillon	Glykogen 2,0 ccm Filtrat Lept. tenuis Bouillon	Glykogen 3,0 ccm Filtrat Lept. tenuis Bouillon
5. 6. 39	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv
	7	8	9	10	Bemerkung	
Datum: 2. 6. 39	Glykogen 1,0 ccm Filtrat Lept. tenuis Bouillon	Glykogen 1,5 ccm Filtrat Lept. tenuis Bouillon	Glykogen 2,0 ccm Filtrat Lept. tenuis Bouillon	Glykogen 3,0 ccm Filtrat Lept. tenuis Bouillon		
5. 6. 39	positiv	positiv?	?	positiv	mikroskop. Untersuchung	

1) Glykogenmenge bei 3, 4, 5, 6 = 1 Messerspitze, bei 7, 8, 9, 10 = 2 Messerspitzen.

Aus dem obigen geht klar hervor, daß die verwendeten Anaerobenstämme auch in aerober Weise mit Hilfe von C-Vitamin gezüchtet werden können. Jene Stoffe, die zur Züchtung notwendig sind, finden wir alle im menschlichen Organismus, und so ist auch das aerobe Wachstum in der Schleimhaut des Mundes vorstellbar. Ob nun diese Stämme das C-Vitamin aus dem menschlichen Organismus herausziehen oder die Stoffwechselprodukte anderer Bakterien aufbrauchen, kann aus diesen Versuchen nicht entschieden werden. Es ist aber wahrscheinlich, daß das C-Vitamin, welches für den menschlichen Organismus unentbehrlich ist, auch den Bakterien im Gewebe nützlich ist.

Zusammenfassung.

1) Der Zusatz von Vitamin C in Gestalt von Askorbinsäure zur Leberbouillon ermöglicht die Züchtung der streng anaeroben Leptothrix tenuis (früher Gi XIX bezeichnet) ohne Vaselinesiegel.

2) In gewöhnlicher Nährbouillon ist dagegen auch bei Anwesenheit des Vitamin C und unter Vaselinesiegel bei diesem Stamm kein Wachstum zu beobachten gewesen.

3) Als wirksamer Bestandteil der Leberbouillon für die Anaerobenzüchtung wurde das Glykogen erkannt. Sein Zusatz zur gewöhnlichen Bouillon, in Verbindung mit Vitamin C, erlaubte die Vermehrung dieses Leptothrixstammes unter Vaselinesiegel.

4) Ein zum Vergleich herangezogener Stamm des Bac. fusiformis erwies sich als weniger anspruchsvoll. Er wuchs auch in gewöhnlicher Bouillon ohne Vaselinesiegel nach Zusatz von Vitamin C.

5) Das verschiedene Verhalten anaerober Stämme gegenüber dem Zusatz von Vitamin C wird sich wahrscheinlich als brauchbares Hilfsmittel für die bakteriologische Diagnose der nicht versporenden Anaerobier erweisen.

Schrifttum.

1) Handb. d. pathog. Mikroorg. (Kolle-Kraus-Uhlenhuth), III. Aufl., Bd. V, 1927. — 2) Zahnärztl. Rdsch. **1939**, Nr 13. — 3) Dtsch. zahnarztl. Wschr. **1936**, Nr 38. — 4) Ebenda **1937**, Nr 2. — 5 Biochem. Z. **298**, 299 (1938). — 6) Z. Hyg. **118**, 544 (1936). — 7) Biochem. Z. **295**, 117 (1938); **297**, 46 (1938); **298**, 301 (1938). — 8) Zbl. Bakter. I Orig. **144**, 72* (1939). Kongreßbericht. Erste Großdeutsche Tagung fur Mikrobiologie in Wien.

Ueber die Züchtung des Streptobazillus Ducrey in flüssigen Kulturen und ihre therapeutische Verwendung.

Romero Cunha,

Assistent des Instituts Vital Brazil Rio de Janeiro-Niteroi.

Seitdem im Jahre 1889 Ducrey in Eiterausstrichen des Ulcus molle einen gramnegativen Streptobazillus feststellte — heute zweifellos als die alleinige Ursache dieser Geschwüre anerkannt —, hat sich eine Reihe von Forschern ununterbrochen darum bemüht, den Bazillus in einfacher Weise aus den Läsionen zu züchten und auch einen Nährboden zu finden, der seinen Lebensbedingungen am besten entspricht.

Istamanoff und Aspianz machten 1897 die erste Mitteilung über Kultur des Bazillus Ducrey, wobei sie eine Mazeration pulverisierter menschlicher Haut dem Agar beifügten. 1898 erhielt Senglet positive Resultate in einem besonderen Agar mit Pepton und Menschenblut. 1900 isolierten Besancon Griffon und Le Sourd den Bazillus in Agar und Kaninchenblut.

Tomascewski (1903), Babes (1905), Stein (1908), Stümpke (1922), Reenstierna (1923), Nicolle (1923), Brauns (1924), Assis (1926), Miravent, Quiroga und Sosa (1926), Sosa (1931), Kabayasi (1937), Akyama (1937), in chronologischer Reihenfolge, benutzten, wenn auch mit einigen Modifikationen, den klassischen Blutagar für die Kultur, bisweilen mit gewissen Schwierigkeiten bei der Isolierung des Bazillus Ducrey. Frey (1926) empfiehlt einen Butter-Gelatine-Agar gemischt mit chylösem Blut. Rivalier (1929) erzielte eine Kultur im Blutagar, dem er eine Mazeration getrockneter Bohnen zufügte.

Koch (1936) machte die rasche Austrocknung des Blutagar hauptsächlich für die Mißerfolge verantwortlich. Er empfiehlt, die Kulturröhrchen herme-

tisch zu verschließen und die Isolierung in Platten vorzunehmen, die ebenfalls mit Hilfe von Zeresin verschlossen sind.

Hunt (1935) empfiehlt eine Methode der Reduktion der Sauerstoffspannung, indem er die dem Blutagar gegenüber befindliche Wand des Röhrchens erhitzt, den Wattestopfen in das Innere schiebt und dann einen Gummistopfen fest hineindrückt. Dieser Autor beobachtete, daß in den Röhrchen, die nicht mit dieser Technik behandelt waren, das Wachstum ausblieb.

Söndersen, Greenblatt und Baethke (1938) bereiten ihre Bakteriensuspensionen in dieser Weise zu.

Was die Entwicklung der Keime in flüssigem Medium anbetrifft, so liegen von Tetsuga (1913) Mitteilungen über Bouillon vor, die mit der Hälfte ihres Volumens mit Blut versetzt wurde, von Nicolle, der Martinsche Bouillon unter Zufügung von 20 Proz. Blut benutzte, und von Lwoff (1937), der im Verlauf von 9 Tagen Wachstum der Keime in Peptonwasser mit Kochsalz, unter Hinzufügung von 1 : 50 Blut, erhielt. Alle Autoren benutzten in erster Linie defibriniertes Kaninchenblut.

Die Kultur ist bis heute schwierig, besonders wenn man Filtrate zu therapeutischen Zwecken bei lokaler Anwendung erhalten will oder kochsalzhaltige Suspensionen für diagnostische Zwecke oder zu Impfversuchen benötigt.

Indessen beschreibt Hababo-Sala (1925) ein flüssiges Medium, und zwar Bouillon, mit 5 Proz. Glyzerin und mit ¼ Eigelb, nach Besredka, versetzt, aber frei von jeglichem Blut, worin er schöne Kulturen erzielte mit einem bemerkenswerten therapeutischen Effekt, wenn sie nach Filtration bei den spezifischen geschwürigen Ulzerationen angewendet werden.

Lipinski (1925) erhielt ebenfalls Reinkulturen in Aszitesbouillon und in Pferdeserumbouillon und sogar in gewöhnlicher Bouillon.

Nicolau und Banciu (1926) sind der Ansicht, daß, während die Anwesenheit von Blut im Anfang eine „conditio sine qua non" für die Kultur ist, der Streptobazillus am Ende einer Periode allmählicher Anpassung im Laboratorium sich in Nährböden ohne Blut, und sogar ohne Serum, entwickeln kann, wenn auch ein kleiner Zusatz des letzteren vorzuziehen sein dürfte.

Auch Assis (1926) kultivierte den Bazillus ohne Blut in Peptonbouillon mit 2 Proz. des 10proz. Serums nach Legroux versetzt. Wenn auch Hababo-Sala, Lipinsky, Nicolau-Banciu und Assis angeben, Erfolge zu haben in blutfreien Nährböden, sind wir doch der Meinung, daß es eine große Zahl von Rassen des Bazillus Ducrey gibt, die ausgesprochen hämophil sind. Diese Autoren arbeiteten natürlicherweise mit einer kleinen Zahl von Stämmen, und für diese erwies sich das Blut als unnötig. Wir müssen hier erwähnen, daß Assis (1926), gelegentlich der Untersuchung von 4 Stämmen, die in Blutagar konserviert waren, nur mit einem von ihnen Kultur in den Nährböden von Hababo-Sala erzielte.

Noch heute ist die Natur der im Blut enthaltenen Substanz, die zur Entwicklung notwendig ist, unbekannt. Der Faktor ist für Lwoff und Piroski (1937) das Hämin. Diese Autoren beobachteten, daß Stämme existieren, welche wenig Blut bedürfen und eine Irregularität in ihrer Entwicklung zeigen.

Himmel (1901) erreichte Kultur in koaguliertem Kaninchenblut, und Teagh und Deibert (1922). welche mit koaguliertem Kaninchenblut, das aber erhitzt war, arbeiteten, isolierten 57 Stämme. Wir können bestätigen, daß das Vorgehen von Teagh außerordentlich einfach ist und ausgezeichnet für die Isolierung des Bazillus Ducrey; indessen überwuchert die sekundäre Bakterienflora leicht die Kulturen infolge der Ueberzahl an Keimen und macht im Konkurrenzkampf ihre Isolierung unmöglich.

In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß Zeissl (1902) eine Symbiose des Streptobazillus mit Diphteroiden beobachtete und Rime (1926) eine solche mit Staphylo-, Strepto-, Diplo- und Enterokokken, Tetragenus, Diphteroiden, Bacillus pyocyaneus, Vincentschen Spirillen, Gonokokken und Tuberkelbazillen.

Tatsächlich besteht eine große Schwierigkeit bei der Isolierung aus dem primären Geschwür. Auch wir hatten bis jetzt darin keinen Erfolg.

Um diese Schwierigkeit zu überwinden, exstirpierten Tomascewski und Serra (1907) unter Anästhesie die Geschwüre, die nach einer Desinfektion auf die Kulturmedien verimpft wurden.

Lenglet und Fischer (1903), Lipschütz (1905) und später Reenstierna, Nicolle, Hababo-Sala Rivalier u. a. mehr vervollkommneten und benutzten die Methode der Reinokulation. Wir selbst bedienen uns heute derselben mit großem Vorteil.

Diese Reinokulation, bei der es sich fast immer um eine Autoinokulation handelt, besteht in einer leichten Skarifikation der Vorderseite des Unterarms, wo das Material des primären Geschwürs eingeimpft wird. Das Exsudat des künstlichen Schankers, der am 3. Tage nach der Impfung eröffnet wird. wird dann auf verschiedene Röhrchen mit dem Teaghschen Nährboden verimpft, welcher in folgender Weise bereitet wird: Das Blut wird aseptisch aus dem Herzen eines Kaninchens mit einer Spritze entnommen und unverzüglich auf sterilisierte Hämolyseröhrchen, 1 ccm in die Mitte eines jeden, verteilt. Die Röhrchen werden etwas schräg gelegt, so daß das Blutkoagulum nach einer gewissen Zeit, bei Laboratoriumstemperatur, schräg anhaftet. Es folgt Erhitzung auf 55° während 5 Min., und in das dann ausgeschwitzte Serum wird das Material verimpft.

Der Nährboden kann sogar 5 Tage nach der Herstellung benutzt werden, aber in diesem Falle darf er nicht inaktiviert und muß bei niedriger Temperatur aufbewahrt werden.

Eine wichtige und wenig erörterte Frage ist, bei welcher Brutschranktemperatur die Kultur des Bazillus Ducrey erfolgt. Aus unseren Versuchen schließen wir, daß die beste Temperatur zwischen 33 und 35° liegt.

Die einzigen Berichte in der Literatur sind von Nicolle (1933), Lwoff (1935) und von Topley und Wilson (1935). Bei 36—37° wächst dieser Keim sehr schlecht und eine Temperatur von 38° ist mit seiner Entwicklung unverträglich.

Um kurz zu berichten, was wir bisher hinsichtlich der Kultur des Bazillus Ducrey erreicht haben, so handelt es sich um einen flüssigen Nährboden, der vollkommen für seine Kultur geeignet ist und der uns das Studium seiner Biologie ermöglicht.

In unserem Laboratorium wurde vor etwa einem Jahr ein Stamm[1]) isoliert, unter Benutzung des Teaghschen Mediums, wobei von einem künstlichen Schanker[2]) ausgegangen wurde. Dieser Stamm wurde weiterhin auf Blutagar[3]) mit defibriniertem Pferdeblut gezüchtet.

Die Kultur des Bazillus Ducrey, zu therapeutischen Zwecken benötigt, war in den flüssigen Nährböden von Hababo-Sala und Assis stets negativ, wurde aber leicht in folgendem Nährboden erhalten:

---

1) Dieser Stamm befindet sich in der Bakteriensammlung des Instituts Vital Brazil und steht zur Verfügung derjenigen, die dafür Interesse haben.

2) Wir möchten hier unseren besonderen Dank für Herrn Dr. Heraldo Macial Ausdruck geben, der in so freundlicher Weise uns die bakteriologische Abteilung des Instituto Naval de Biologia, ebenso wie die Kranken dieses Instituts zur Verfügung stellte.

3) Die Brauchbarkeit des Agars rühmte bereits Assis für die Kultur des Gonokokkus.

A. Bouillon mit 1 Proz. Pepton. 2 Gewichtsteile Rindfleisch zu einem Teil Wasser. Wasserbad von 50° während ½ Std. Kochen und durch ein Tuch filtrieren. Trockenpepton (die besten Resultate wurden erhalten mit Pepton-Proteose Difco) 1 Proz. hinzufügen. Reaktion kontrollieren und auf pH 7,6 einstellen. Leicht kochen und filtrieren durch Filtrierpapier. Auf Reagenzgläser (10 ccm) und Ballons verteilen, im Autoklav bei 110° während 20 Min. sterilisieren.

B. Glyzerin mit Hämoglobin. Ein Teil reines Glyzerin (wir bevorzugen Merck), in Kolben von 500 ccm sterilisiert, wird mit zwei Teilen von defibriniertem und sterilem Rinderblut versetzt. Die Mischung ist im Eisschrank unbegrenzt haltbar. Drei Wochen nach der Zubereitung kann sie gebraucht werden, wenn eine komplette Lösung der roten Blutkörperchen eingetreten ist. Bei Schütteln der Flasche ist die Lösung von einer kräftig roten Farbe. Zwischendurch die Sterilität kontrollieren. Zu der Peptonbouillon 1 Proz. der Blutlösung hinzufügen und gut schütteln, um eine vollkommen homogene Flüssigkeit zu erhalten. Diese Mischung sollte am besten bei Gelegenheit der Weiterimpfung hergestellt werden, und zwar sind einem Röhrchen mit 10 ccm der Bouillon 2 Tropfen der Blutlösung aus einer Kapillarpipette hinzuzufügen. In diesen Nährboden werden die Ducreyschen Bazillen verimpft, indem man direkt von der Kultur auf Blutagar ausgeht. Nach 24 Std. Aufenthalt im Brutschrank bei 34° beginnt ein Wachstum sich zu zeigen, eine richtige Flockenbildung, die nach 48 Std. sehr deutlich wird, weiterhin eine grobe Flockenbildung im Nährboden, Körnchen innerhalb der Flüssigkeit, oder an den Seiten des Röhrchens anhaftend, ferner ein reichlicher Bodensatz aus gröberen Körnchen bestehend. Am 3. Tage wird eine charakteristische Kahmhaut erkennbar, welche im weiteren Verlauf sich außerordentlich stark entwickelt. Ihr Aussehen erinnert an die Kultur irgendeines Myzeten; sie ist von grauweißer Farbe und bedeckt die gesamte Oberfläche der Flüssigkeit, mit der Tendenz, sich zu verteilen und auseinanderzufallen, so daß man beim Herabsinken derselben an den Anblick von Stalaktiten erinnert wird. Auf einen Objektträger gebracht, ist die Bakterienmasse von mehliger Beschaffenheit und sehr leicht zerreißlich.

Hinsichtlich ihrer Morphologie zeigen sich die Bakterien sowohl in der Kahmhaut wie auch in dem Bodensatz stets von typischem Aussehen: Anordnung in Ketten, die aus bazillären, immer gramnegativen Elementen, länglich, zart und bipolar gefärbt, zusammengesetzt sind.

Neben diesen Formen, die sich uns bisweilen als richtige Knäuel von unendlich langen Ketten darstellen, findet man auch Diplobazillen und isolierte Bazillen (Fixation nach Marchoux).

Der Nährboden, welcher ursprünglich einen leicht rötlichen Ton zeigt, bekommt nach dem ersten Tag der Bebrütung einen orangefarbigen und weiterhin einen ganz hellgrünen Ton; dies beruht offenbar auf der Wirkung der Keime auf das Hämoglobin, das wohl in Methämoglobin umgewandelt wird.

Die Kulturen bewahren eine lange Lebensdauer (einen Monat oder mehr). Sie werden zweckmäßig bei niedriger Temperatur aufbewahrt.

In erster Linie muß der Bodensatz und nicht die Kahmhaut als Material für Weiterimpfung benutzt werden.

In Kulturen, die einen Monat im Brutschrank (in Ballons von großem Volumen) aufbewahrt und dann mit 0,5 Proz. Phenol versetzt wurden, bildet sich ein Niederschlag, der aus Albuminen besteht. Nach Filtration durch Papier und schließlich durch Berkefeldkerzen erhalten wir ein klares Filtrat, das frei von Blutpigment ist und eine Farbe und Durchsichtigkeit wie die ursprüngliche Peptonbouillon aufweist. Das Filtrat ist offensichtlich reich an Anti-

virus und von bemerkenswerter Wirkung bei seiner therapeutischen Verwendung, wenn es auf die geschwürigen Läsionen des weichen Schankers appliziert wird, eine Wirkung, über die schon Hababo-Sala, Assis und Fraga berichtet haben. Wir erhalten auch bakterienreiche Suspensionen in Kochsalzlösung in einfacher Weise, indem wir von dem zentrifugierten Bodensatz der Kulturen ausgehen. Diese Suspensionen können für therapeutische Impfungen Verwendung finden, wie sie durch Nicolle und Durand empfohlen wurden und auch zu diagnostischen Zwecken in der Form der Intrakutanreaktion, wie sie zum erstenmal durch Tetsuga (1913) angewendet wurde. Der Wert der Probe ist durch Reentstierna (1923) und neuerdings durch Sanderson und Greenblatt (1937) bestätigt worden.

Zusammenfassung.

Der Autor weist darauf hin, daß wahrscheinlich Stämme des Bazillus haemophilus Ducrey existieren, die ausgesprochen hämophil sind, obwohl von Hababo-Sala, Assis, Lipinsky und Nicolau und Banciu die Entwicklung einiger Stämme in Nährböden erzielt wurde, die frei von Blut oder Blutserum waren.

Er gibt einen Nährboden an, der aus Peptonbouillon besteht, welche mit 1 Proz. einer Hämoglobin-Glyzerinlösung versetzt ist, und in welchem er schöne Kulturen des Ducreyschen Bazillus erhielt, die alle Charakteristika ihrer Morphologie aufwiesen, und in denen sich nach 3tägiger Bebrütung eine Kahmhaut bildete (in der Literatur noch nicht beschrieben), die ein sehr gutes und charakteristisches Aussehen zeigte. Es wird auch darauf hingewiesen, daß eine Brutschranktemperatur von 33—35° die am meisten geeignete zur Kultivierung des Bazillus Ducrey ist.

Schließlich wird auch auf die therapeutische Verwendung der Filtrate alter Kulturen bei lokaler Anwendung am Ulcus molle hingewiesen und auch auf die technisch leicht erhaltbaren Suspensionen der Keime in Kochsalzlösung für diagnostische und therapeutische Impfungen.

[Aus dem Sero-bakteriologischen Institut der Universität Helsinki (Vorstand: Prof. Dr. med. Osv. Streng).]

Ueber die Entwicklung der Bakteriophagenresistenz bei Salmonella Breslau.

Von Dr. med. T. W. Wartiovaara.

Das Auftreten eines Bakteriophagen in einer in üblicher Weise hergestellten Bakterienreinkultur ist ein sehr gewöhnliches Vorkommnis (Gildemeister u. Herzberg, Kline, Hadley, Fukuda, Grumbach, Klieneberger, Burnet u. a.). Meistens hat man konstatiert, daß die Bakterien einer derartigen als Bakteriophagenträger oder lysogener Stamm bezeichneten Kultur gegen die Wirkung des in der Kultur verborgenen Phagen

resistent sind. Hadley und Fukuda haben jedoch Bakteriophagen auch in einer Bakterienkultur entdeckt, die ihrer Einwirkung gegenüber sensibel war.

Im folgenden sind einige Beobachtungen darüber mitgeteilt, wie man in einer Kultur von Salmonella typhi murium (Breslau) beim Verfolgen ihrer Dissoziation einen Bakteriophagen herausgebracht hat, gegen dessen Wirkung die ursprüngliche Bakterienkultur sensibel ist. Unter Benutzung dieses Phagen und des genannten Bakteriums zu Experimenten ist dann versucht worden, die Bedingungen zu ermitteln, die an der Entwicklung einer gegen den Einfluß des Phagen resistenten Bakterienform mitwirken. Schließlich sind einige Beobachtungen darüber angeführt, wie sich die untersuchten Bakterien gegenüber den mit ihrer Hilfe ad modum Nyberg aus Abwasser gewonnenen Phagen verhalten.

Der Fall, wo ein Phage in einer sensibeln Bakterienkultur zu finden ist, erscheint besonders interessant vom Standpunkt der Theorien, nach welchen ein Phage als Produkt des Bakterienstoffwechsels entstehen kann. Die im folgenden beschriebenen Versuche streben indessen nicht danach, diese Frage zu klären.

Technik.

Bouillon: Liebigs Fleischextrakt 2 Proz., Mercks Pepton 1 Proz., NaCl 1 Proz., p_H 7,5, bei 120° C 30 Min. lang im Autoklaven sterilisiert.

Nähragar: wie oben + Agar 1,5 Proz.

Bakterienfilter: Chamberland L 3 und L 5.

Die Bestimmung des Wirkungseffekts des Phagen ist meistens nach dem Bergstrandschen Verfahren vorgenommen worden, wobei in Bouillonröhrchen auf die Weise eine Serie 10facher Verdünnungen hergestellt wird, daß jedesmal unter Verwendung einer neuen, sterilen 1 ccm-Pipette 0,3 ccm Flüssigkeit in das folgende Röhrchen übergeführt wird, in dem sich 2,7 ccm Bouillon befinden. Die Serie ist mit 18—24 Std. auf einer Schrägagaroberfläche gewachsenen Bakterien so inokuliert worden, daß die aus letzteren in Bouillon bereitete, deutlich getrübte Suspension weiterhin so stark verdünnt wurde, daß aus einem auf der Oberfläche einer Agarschale ausgebreiteten Tropfen ca. 20—60 Kolonien wuchsen. Von dieser Verdünnung ist in jedes Röhrchen der Verdünnungsserie des Phagen mit der Pipette 1 Tropfen eingebracht. Die wichtigste Ablesung des Resultates ist ausgeführt, nachdem die Röhrchen 20—24 Std. lang bei 37° C im Wärmeschrank gestanden hatten.

Die Absorbierung des Phagen mittels durch Erwärmen getöteter Bakterien ist nach der von Levine und Frisch angegebenen Methode bewerkstelligt worden.

Die Unterscheidung der in der Kultur befindlichen sensibeln und resistenten Zellen wurde in der Weise besorgt, daß ein Bakteriengemisch von passender Verdünnung auf die Oberfläche einer Schale ausgebreitet wurde, deren Nähragar in geschmolzenem Zustand bei + 45° so viel von einem phagenhaltigen Bouillonfiltrat (z. B. 0,1—5 Proz.) zugesetzt worden war, daß ein sensibles Kontrollbakterium höchstens stark zerrissene Kolonien darin zu bilden vermochte. Die Phagen-Agarschalen sind vor dem Gebrauch zur Kontrolle der Sterilität 24 Std. lang bei + 37° aufbewahrt worden. Wenn sie zur Verwendung kamen, ist gleichzeitig immer eine Impfung auf gewöhnlichen Agar vorgenommen worden.

Ueber solche mit der Technik zusammenhängende Umstände, von denen man annehmen kann, daß sie für das Verständnis des bei dem Versuch erhaltenen Resultates bedeutungsvoll sind, wird bei Gelegenheit der Beschreibung der Versuche getrennt berichtet.

Die Isolierung des Phagen aus der Bakterienkultur.

Das zu untersuchende Bakterium war eine in unserm Laboratorium durch monatliche Verimpfung auf Schrägagar beinahe 2 Jahre am Leben erhaltene, ursprünglich aus Berlin bezogene Salmonella typhi murium (Breslau) von serologisch spezifischem Typus. Es wuchs, wenn es von dem Schrägagar oder aus einer 24 Std. alten Bouillonkultur auf die Oberfläche von Agarschalen verimpft wurde, zu vollständig runden, wenig gewölbten typischen S-Kolonien aus.

Dieser Bakterienstamm wurde in Bouillon weitergezüchtet, indem von einer 24 Std. bei + 37° im Thermostaten gewachsenen Bouillonkultur eine Oese voll in ein neues Bouillonröhrchen übertragen wurde, eine Impfung, die jeden Tag, immer aus dem am vorigen Tage beimpften Röhrchen in ein neues Röhrchen, wiederholt wurde. Gleichzeitig wurde täglich eine Ueberimpfung auf Agarschalen vorgenommen. Auf diesen wuchsen, nachdem die Impfung von einem in das andere Bouillonröhrchen etwa 5—8mal ausgeführt worden war, unter den gewöhnlichen großen S-Kolonien meistens auch einige ganz kleine, runde, wasserklare Kolonien von 0,2—0,5 mm Durchmesser. Um die gleiche Zeit oder bisweilen 2—3 Tage später als diese, erschienen auf den Agarschalen zunächst vereinzelte, bei den folgenden Ueberimpfungen immer zahlreichere große typische R-Kolonien mit rauher Oberfläche und ungleichmäßigem Rande.

Wie gewöhnlich bei der Dissoziierung einer Bakterienkultur traten neben den oben geschilderten Kolonieformen manchmal sogar reichliche Mengen verschiedenartiger SR-Zwischenformen auf: weniger glatte S-Kolonien, vollständig runde R-Kolonien, selten radiär gestreifte R-Kolonien oder kleinere, stark konvexe S-Kolonien, ganz kleine Kolonien mit bisweilen deutlich unebenem Rande usw. Die erwähnten besonderen Kolonieformen ließen sich, abgesehen von der typischen R-Form, nicht als solche weiterzüchten. Eine Impfung in Bouillon und daraus weiterhin auf Agar ergab bei mehrmaliger Wiederholung eine Plattenkultur, aus welcher die gesuchte spezielle Kolonieform verschwunden und an ihrer Stelle entweder bloße R-Kolonien oder ein Gemisch aus weniger speziellen Kolonieformen aufgetreten sein konnten. Die der ursprünglichen entsprechende S-Form blieb bei der Ueberimpfung von Agar auf Agar als solche relativ gut, bei täglich ausgeführten Impfungen mehrere Monate lang ganz unverändert erhalten.

Die täglich vorgenommene Ueberimpfung in ein neues Bouillonröhrchen bildete nicht die unerläßliche Voraussetzung für die Dissoziierung. Wenn von der ursprünglichen Schrägagarkultur eine Ueberimpfung in ein Bouillonröhrchen stattgefunden hatte und dies Röhrchen zuerst auf 24 Std. einer Temperatur von + 37° ausgesetzt sowie hierauf weiterhin 10—16 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt worden war, konnten auf den daraus angelegten Platten die obenbeschriebenen verschiedenartigen Kolonieformen nachgewiesen werden.

Dem Auftreten und den Eigenschaften der Kleinkolonien ist bei der vorliegenden Arbeit besondere Beachtung geschenkt, weil es gelang, aus diesen durch Weiterzüchtung den Bakteriophagen zu isolieren.

Von den Kleinkolonien waren meistens nur einige in verhältnismäßig dicht beimpften, ca. 100—300 Kolonien aufweisenden Schalen zu sehen. Manchmal konnten sie in reichlicheren Mengen vorkommen, höchstens aber etwa $^1/_{20}$ der gesamten Kolonienzahl ausmachen.

Die kleinen Kolonien ließen sich, wie gesagt, nicht als solche weiter reinzüchten. Wenn von einer Kleinkolonie eine Impfung direkt auf Agar oder in Bouillon und dann auf Agar vorgenommen wurde, wuchsen darauf oft

nur gewöhnliche S- oder R-Kolonien. Auf jeden Fall bildeten sie die Mehrheit unter den Kolonien der neuen Kultur. In einigen Fällen war jedoch die Folge einer so betriebenen Weiterzüchtung einer Kleinkultur, daß die relative Anzahl der Kleinkolonien in den neuen Kulturen bedeutend zunahm. Auf die Art konnte man Plattenkulturen bekommen, in denen mehrere Kleinkolonien in 1—2 cm Entfernung von den nächsten gewöhnlichen Kolonien wuchsen. Es war also in der Tat möglich, zu sehen, daß das Auftreten der Kleinkolonien nicht nur von den Faktoren abhing, die das Wachstum sämtlicher Kolonien auf dicht bewachsenen Schalen hindern. Beim Durchmustern derartiger in passender Weise gelungenen Plattenkulturen konnte man ferner feststellen, daß neue, mit einer 10fach vergrößernden Lupe eben wahrnehmbare Kleinkolonien erst nach 48—72stünd. Wachstumszeit in den Schalen auftreten konnten. Die weit von den anderen entfernt gelegenen Kleinkolonien wuchsen auch niemals zu gewöhnlichen S- oder R-Kolonien aus[1]), sondern vergrößerten sich höchstens bis zu einem Durchmesser von ca. 1—2 mm, wenn die Schalen weiterhin 3×24 Std. im Wärmeschrank aufbewahrt wurden.

Beim Betrachten der von Kleinkolonien hergestellten, nach Gram gefärbten Präparate konnte man konstatieren, daß darin häufig ähnliche ganz kleine Stäbchenbakterien wie in 24 Std. gewachsenen S- und R-Kolonien vorzukommen schienen. In einigen Kleinkolonien, zumal gerade in den allerkleinsten, waren sehr reichlich große, ca. 4—8 μ lange, oft schwach gefärbte Stäbchen vorhanden, an denen vakuolenartige Stellen im Zellinnern vorkommen konnten; selten war die ganze Zelle oval aufgetrieben. Der Form der Bakterienzellen ist übrigens bei dieser Arbeit keine größere Beachtung geschenkt worden. Hadley hat die von ihm in dissoziierten Bakterienkolonien angetroffenen, in sehr kleinen Kolonien wachsenden Bakterien als G-Form bezeichnet. Bei den von ihm beschriebenen Versuchen hat sich die G-Form als solche weiterzüchten lassen und haben die Kleinkolonien vorwiegend winzige, an Kokken erinnernde Zellen enthalten. Weil die oben von mir geschilderten Kleinkolonien gerade in diesen zwei Beziehungen von den bei Hadley beschriebenen abweichen, habe ich für dieselben keine bestimmte Bezeichnung gebrauchen wollen. Meine Beobachtungen erinnern dagegen in vieler Hinsicht an die Erscheinungen, die Nyberg bei den von ihm während der Dissoziierung eines Aerobakterstammes gefundenen Kleinkolonien festgestellt hat.

Dann, wenn es beim Weiterzüchten der Kleinkolonien gelungen war, die relative Anzahl derselben deutlich zu steigern, wurde fast regelmäßig konstatiert, daß in den neuen Plattenkulturen gleichzeitig einige an ihren Rändern seltsam zersplitterte S- oder R-Kolonien, typische „Flatter“-Formen erschienen. Wenn von einer „Flatter“-Kolonie oder aus einer solchen Bouillonkultur, aus der „Flatter“-Kolonien gewachsen waren, eine Ueberimpfung in Bouillon vorgenommen wurde, konnte man in der nach 24stünd. Wachstum durch eine Chamberland-Kerze filtrierten Flüssigkeit stets einen auf die ursprüngliche S- oder R-Form einwirkenden Bakteriophagen nachweisen.

Wenn von einer Kleinkultur direkt auf Agarschalen geimpft wurde, konnten auf diesen zuweilen „Flatter“-Kolonien wachsen. Meistens kamen solche jedoch erst dann zum Vorschein, wenn eine von einer Kleinkolonie angelegte Bouillonkultur über 24 Std. bei + 37° gewachsen war, wie aus dem in Tabelle I dargestellten Versuch hervorgeht.

Trotz wiederholter Versuche gelang es niemals, „Flatter“-Kolonien in solchen Agarschalen zu entdecken, in welche die Ueberimpfung direkt aus dissoziierten Bouillonkulturen stattgefunden hatte, ohne daß zunächst eine

1) Die Schalen wurden nicht in der feuchten Kammer gehalten.

Tabelle I.

Aus Agarkulturen, welche nach 3maliger Ueberimpfung von einer Kleinkolonie gewonnen waren, wurden 10 verschiedene Kleinkolonien in 10 Bouillonröhrchen übergeführt und von diesen nach 8 Std. und 43 Std. in Agarschalen geimpft.

Zeit des Wachstums	In den Agarkulturen	Nr. der Bouillonkultur									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
8 St.	Kleinkolonien	++	+	++	+	+	+	+	+	+	+
	Flatterkolonien	++	—	—	+	—	—	—	—	—	—
43 St.	Kleinkolonien	++	+	++	++	++	++	+	+	+	++
	Flatterkolonien	+	—	++	++	+	+	+	++	++	++

++ = in dicht gewachsenen Agarkulturen reichlich von den genannten Kolonieformen;
\+ = „ „ „ „ einige „ „ „ „
— = „ „ „ „ keine „ „ „ „

oder mehrere Ueberimpfungen von einer isolierten Kleinkolonie in Bouillon und von da auf Agar ausgeführt waren. Anderseits ließ sich auch in solchen Filtraten keine Phagenwirkung nachweisen, die nach verschieden langen Wachstumszeiten (1—30 Tagen) ohne Ueberimpfung einer Kleinkolonie aus dissoziierten Bouillonkulturen gewonnen wurden. Auf Grund dieser Erfahrung muß man es wohl als wahrscheinlich betrachten, daß 1. dem Auftreten von Kleinkolonien ein wichtiger Anteil bei der Herausbringung des in der Kultur verborgenen Phagen zukommt, und daß 2. das Vorkommen von Kleinkolonien in einer dissoziierten Kultur an und für sich noch nicht bedeutet, daß ein eigentlicher durch Filtrieren isolierbarer Phage darin wirksam wäre.

Fukuda hat festgestellt, daß schwache Phagen speziell in solchen Kulturen zum Vorschein kamen, bei denen die Bakterienmasse nach dem Zentrifugieren mehrmals zum Wachsen in eine neue Nährlösung übergeführt wurde. Ich habe versucht, das bei den oben beschriebenen Versuchen erhaltene Resultat unter Anwendung einer der von Pukuda angegebenen, im Prinzip ähnlichen, aber etwas modifizierten Methode zu kontrollieren:

Die 24 Std. auf einer Schrägagaroberfläche gewachsenen Bakterien wurden mit 10 ccm Bouillon in ein Zentrifugenröhrchen gespült, das in den Thermostaten gesetzt wurde. Die Bakterien wurden täglich (bei manchen Versuchen einmal in der Woche) an den Boden zentrifugiert, die Flüssigkeit in 30 ccm sterile Bouillon gegossen und so verdünnt durch eine Chamberlandkerze filtriert. Der Bakterienmasse wurden abermals 10 ccm Bouillon zugesetzt, das Röhrchen in den Thermostaten gestellt; am folgenden Tage wieder zentrifugiert usw. Gleichzeitig wurden von den Bakterien Ueberimpfungen auf Agarschalen vorgenommen.

Von der ursprünglichen S-Form des untersuchten Bakteriums und der aus dieser in gewöhnlichen Bouillonkulturen entwickelten R-Form konnte bei einschlägigen Versuchen nach 6—12maligem Zentrifugieren ein schwach wirkender Phage isoliert werden, der sich weiterhin in üblicher Weise leicht verstärken ließ. Auch bei diesen Versuchen traten typische „Flatter“-Kolonien bei den Ueberimpfungen in Agar auf, gleichzeitig auch ein durch Filtrieren isolierbarer Phage. Eine ursprünglich größere Bakterienmenge und ein Zentrifugieren in längeren Zwischenräumen schienen das Auftreten der „Flatter“-Kolonien und des filtrierbaren Phagen erheblich zu verzögern.

Die beiden angegebenen Methoden scheinen indessen die Auffindung des Phagen nicht in jeder beliebigen Bakterienkultur zu erleichtern. Aus Salmonella paratyphi B- und Escherichia paracoli-Kulturen habe ich durch Weiterimpfung von Kleinkolonien vergeblich einen filtrierbaren Phagen

herauszubringen versucht. 10 verschiedene Escherichia coli-Stämme habe ich gleich, nachdem sie aus dem Harn von Pyelitispatienten isoliert waren, in der Weise behandelt, daß sie nach täglichem Zentrifugieren immer in neue Bouillon übergeführt wurden. Im Verlauf von 10 Tagen konnte man bei allen derartig behandelten Kulturen eine Dissoziierung in verschiedenartige Koloniformen und in den meisten auch Kleinkolonien, aber in keiner einzigen deutliche „Flatter"-Kolonien, noch in ihren Filtraten eine Phagenwirkung konstatieren.

Bei den von Fukuda beschriebenen Versuchen entwickelten sich beim Wachsen einer reichlichen Bakterienmasse in dauernd erneuertem Nährboden „unreife" Bakteriophagen, die sich nicht filtrieren ließen, obwohl man aus den von ihnen erzeugten „Löchern" in vielen Generationen neue Bakterienkulturen mit Löchern erhalten konnte.

Den Anteil der Kleinkolonien an dem Zutagetreten des von mir entdeckten Breslauphagen könnte man vielleicht dahin auffassen, daß eine Art Vorstufe der Phagenwirkung an dem Erscheinen der langsam wachsenden Kleinkulturen schuld wäre, bei welcher der wirksame Faktor als solcher nicht filtrierbar ist. Sein „Ausreifen" zu der filtrierbaren Form käme in diesem Fall darin zum Ausdruck, daß er dann die Entstehung von „Flatter"-Kolonien hervorzurufen vermöchte.

Die Verstärkung der Phagenwirkung.

Das erste nach den oben beschriebenen Methoden aus den Kulturen gewonnene Phagenfiltrat war regelmäßig nur schwach wirksam. Eine deutliche Hemmung des Bakterienwachstums war meistens nur in den Verdünnungen 10^{-1}—10^{-3}, eine vollständige Hemmung niemals nachzuweisen. Die dauernde Verstärkung des Phagen wurde in üblicher Weise dadurch bewerkstelligt, daß er in mehreren Generationen zusammen mit den ursprünglichen sensibeln Bakterien gezüchtet wurde. Bei manchen Versuchen wurden folgende Mengen verwendet: Bouillon 30 ccm, Filtrat 3 ccm, Bakterien ca. 1 Mill. Zellen (0,3 ccm einer 16—24 Std. gewachsenen, auf 1 : 1000 verdünnten Bouillonkultur): 24 Std. bei $+37^{0}$ aufbewahrt und danach filtriert.

Tabelle II.

Bakterienwachstum in 3 Verdünnungsserien des Phagenfiltrats, welche mit 3 verschiedenen Bakterienmengen inokuliert wurden. Aus einem Tröpfchen der Bakterienverdünnung 10^{-6} wuchsen in der Plattenkultur 80 Kolonien hervor.

Bakt.-susp. verdünnt	Die Trübung *) in Bouillonröhrchen, in welchen die Verdünnung des Filtrats war									
	10^{0}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	Kontr.
10^{0}	(+)	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+	++	++
10^{-3}	—	—	+	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+	++	++
10^{-6}	—	—	—	±	±	(+)	(+)	+	+	++	++

*) Nach 26 Std. bei 37° C ++ = stark getrübt; + = deutlich getrübt; (+) = schwach getrübt; ± = sehr schwach getrübt; — = klar.

Die Bedeutung der Bakterienmenge und der Wachstumszeit für die Verstärkung des Phagen wurden in mehreren Versuchsserien sowohl unter Verwendung schwacher wie lytisch wirkender Filtrate zu ermitteln versucht. Bei diesen Versuchen wurde kein eindeutiges Resultat erhalten. Eine sehr große Bakterienmenge und eine kurze Wachstumszeit des Phagen-Bakteriengemisches ergaben im allgemeinen ein neues Filtrat, das schwächer als das vorige war.

Die Abnahme und Zunahme im Wirkungseffekt des filtrierbaren Phagen wurden auch in solchen Versuchsserien zu verfolgen versucht, bei denen gleichzeitig die unter dem Einfluß des Phagen erfolgende Entstehung einer resistenten Bakterienform in der anschließend näher auseinandergesetzten Weise beobachtet wurde.

Die Entwicklung einer resistenten Bakterienform.

Um die unter der Einwirkung des Phagen stattfindende Entstehung einer resistenten Bakterienform möglichst genau verfolgen zu können, habe ich mich einer Untersuchungsmethode bedient, die es ermöglicht, die relative oder absolute Anzahl der in der untersuchten Probe enthaltenen sensibeln Bakterien und der darin enthaltenen resistenten Bakterien abzuschätzen. Wenn die Ueberimpfungen von einer Bakterienkultur gleichzeitig auf die Oberfläche einer gewöhnlichen Agarschale und auf die Oberfläche einer Schale mit phagenhaltigem Agar vorgenommen werden, wachsen die „normalen" sensibeln Bakterien nur auf dem gewöhnlichen Agar in regelmäßigen Kolonien. Die resistenten Bakterien wachsen auf beiden Schalen in gleichartigen Kolonien.

Die Methode gibt in der Tat nur darüber vollkommen sichere Auskunft, daß die dabei als sensibel festgestellten Zellen, aus denen sich auf Phagenagar überhaupt keine Kolonie oder höchstens eine „Flatter"-Kolonie entwickelt, wirklich gegen die Phagenwirkung empfindlich sind. Mit ihrer Hilfe kann man auch in einer anscheinend resistenten Kultur mit Leichtigkeit eine geringe Menge sensibler Zellen entdecken.

Dagegen kann man sich vorstellen, daß die Wirkung eines dem Agar zugesetzten Phagen einen Teil der Bakterien, die im Impfungsaugenblick noch empfindlich gegenüber der Phagenwirkung gewesen sind, erst während des in der Schale stattfindenden Wachstums resistent macht. Weil man die Phagenresistenz nur dadurch nachweisen kann, daß man einen lebenden Phagen auf wachsende Bakterien einwirken läßt, geht in alle diese Methoden, die zur Feststellung der Phagenresistenz benutzt werden, dieselbe Fehlermöglichkeit ein. Mit Hilfe der hier beschriebenen Methode kann man den Nachweis dafür, daß die Bakterienkultur wahrscheinlich vollkommen resistent ist, nur dadurch erbringen, daß es bei mehrmals wiederholten Ueberimpfungen niemals gelingt, sensible Zellen zu entdecken.

Durch Ueberimpfen auf phagenhaltige Agarschalen konnte man feststellen, daß der ursprüngliche in Schrägagarröhrchen weitergezüchtete Bakterienstamm ausschließlich sensible Zellen enthielt.

Wenn es gelang, aus dissoziierten Bouillonkulturen durch Ueberimpfen auf Agarschalen R-Kolonien und die oben beschriebenen Kleinkolonien zum Wachsen zu bringen, waren auch in diesen nur sensible Zellen nachzuweisen.

Durch weiter fortgesetzte Ueberimpfung von Kleinkolonien gelang es, „Flatter"-Kolonien zu erzeugen, aus denen sich der Bakteriophage selbst leicht isolieren ließ. In diesen typischen „Flatter"-Kolonien waren auch keine resistenten Bakterien zu entdecken. In solchen Bouillonröhrchen, die mit Bakterien aus einer Kleinkultur inokuliert waren, und aus denen bei fortgesetzter Ueberimpfung reichlich „Flatter"-Kolonien wuchsen, entwickelten sich im Verlauf einer längeren Zeit (5 Tage im Brutschrank) nur selten resistente Bakterien.

Bei den Versuchen, bei denen ein Phage nach der Methode Fukudas in den Kulturen herausgebracht wurde, indem man die Bakterienmasse nach dem Zentrifugieren täglich in neue Bouillon überführte, konnte man kon-

statieren, daß sich resistente Bakterien manchmal gleichzeitig, manchmal 1—3 Tage später entwickelten als die erste Phagenwirkung in dem von der Kultur gewonnenen Filtrat nachweisbar war.

Als Zusammenfassung des Obigen kann man wohl sagen, daß bei der vorliegenden Arbeit tatsächlich ein schwacher Bakteriophage aus einer Kultur herausgebracht worden ist, die nur sensible Zellen enthielt, und daß dieser Phage meistens schon aus der Bakterienkultur isoliert werden konnte, bevor seine Wirkung zur Entstehung einer resistenten Form geführt hatte.

Als es gelungen war, den Wirkungseffekt des Phagenfiltrates auf die früher beschriebene Weise zu verstärken, war es unter Verwendung eines derartigen verstärkten Phagen leicht, die in einer Bouillonkultur wachsenden sensibeln Bakterien in resistente umzuwandeln. In mehreren Versuchsserien wurde insbesondere der Umstand zu verfolgen versucht, wie rasch sich die Entwicklung der resistenten Form vollzieht, wenn zu den Versuchen verschieden große Bakterien- und Phagenfiltratmengen benutzt werden.

In Tabelle III ist das Ergebnis eines Versuchs wiedergegeben, bei dem in drei verschiedenen Phagenmengen in dem gleichen Bouillonvolumen in Parallelserien zwei verschieden große Bakterienmengen inokuliert wurden, wonach von allen Röhrchen nach Verlauf von 6, 20 und 44 Std. je eine Ueberimpfung auf gewöhnlichen und auf Phagenagar vorgenommen wurde. Aus der Tabelle erhellt, daß sowohl eine größere Phagen- als eine größere Bakterienmenge danach angetan ist, die Entwicklung der resistenten Form zu beschleunigen.

Tabelle III.

Zwei ahnliche Verdunnungsserien desselben Phagenfiltrats in Bouillonröhrchen mit 5 ccm Flussigkeit wurden mit zwei verschiedenen Bakterienmengen inokuliert. Aus einem Tropfchen der Bakterienverdünnung 10^{-6} wuchsen in der Plattenkultur etwa 300 Kolonien hervor. In der Tabelle ist die Zeit angegeben, welche für die Entwicklung der resistenten Bakterienform notig war.

Die Verdünnung des Phagenfiltrats	Inokuliert mit 1 Tröpfchen der Bakterienverdünnung	
	10^{0}	10^{-6}
10^{-1}	6	—
10^{-4}	(6) 20	(20) 44
10^{-7}	(6) 44	44

(6) = einige resistente Bakterien nach 6 Std. zu konstatieren;
6 = die Mehrzahl der Bakterien nach 6 Std. sind resistent;
— = kein Bakterienwachstum in 44 Std. wahrnehmbar.

In Tabelle IV ist das Ergebnis eines Versuchs dargestellt, bei dem in gleicher Weise genauer verfolgt wurde, wie ein Phagenfiltrat, in starker Konzentration verwendet, auf die Entstehung der resistenten Form einwirkt, wenn man es auf verschieden große Bakterienmengen unter sonst ganz gleichen Verhältnissen einwirken läßt. Bei diesem Versuch wurden die Proben in kürzeren Intervallen, nach 2, 4, 8, 12, 24, 46 Std. entnommen. Der Versuch wurde gleichzeitig mit den ursprünglichen, die ganze Zeit in Schrägagarröhrchen gezüchteten Bakterien und den aus diesen nach der Dissoziierung der Kultur erhaltenen sensibeln S- und R-Bakterien angestellt.

Aus der Tabelle geht hervor, daß die resistente Form sich am schnellsten in den Röhrchen entwickelte, in denen man die benutzte reichliche Phagenmenge auf eine relativ große Bakterienmenge einwirken ließ, daß aber eine sehr große Bakterienmenge auch eine bedeutende Verzögerung in der Entstehung der resistenten Form verursachen kann.

Tabelle IV.

Eine Reihe von Rohrchen, die alle 5 ccm auf 1 : 10 verdünntes Phagenfiltrat enthielten, wurde mit verschiedenen Bakterienmengen inokuliert. Der Versuch wurde mit drei Bakterienkulturen gleichzeitig ausgeführt. Aus einem Tropfchen der Bakterienverdünnung 10^{-6} wuchsen in den Plattenkulturen 25—65 Kolonien hervor.

In der Tabelle ist die Zeit angegeben, welche fur die Entwicklung der resistenten Bakterienform notig war.

Bakterienform	Inokuliert mit 1 Tropfchen der Bakterienverdünnung			
	10^{0}	10^{-2}	10^{-4}	10^{-6}
Br. sp. (urspr. Schragagarkultur	sens.	8	46	sens.
S	46	8	sens.	24
R	(12) 46	(12) 24	46	24

(8) = einige resistente Bakterien nach 8 Std. zu konstatieren;
8 = nach 8 Std. die Mehrzahl der Bakterien resistent;
sens. = nach 46 Std. nur sensible Bakterien vorhanden.

Die größte Bedeutung scheint dem Umstand zuzukommen, wie rasch die Vermehrung der Bakterien vor sich zu gehen vermag, wenn sie in phagenhaltiger Bouillon wachsen. Das Bakterienwachstum kann man entweder dadurch verfolgen, daß man Beobachtungen über die Trübung eines flüssigen Nährbodens oder Beobachtungen darüber anstellt, wie zahlreiche Bakterienkolonien sich auf der Oberfläche einer gewöhnlichen Agarschale aus den nach Verlauf verschieden langer Zeiten ausgeführten Inokulationen entwickeln.

Im Zusammenhang mit dem in Tabelle IV wiedergegebenen Versuch konnte man demnach konstatieren, daß die größte Bakterienmenge (bez. 10^{0}) in den phagenhaltigen Röhrchen die ganze Zeit über reichlich blieb. Die nächstgrößte Bakterienmenge (bez. 10^{-2}) verminderte sich während der ersten 4 Std. erheblich, hatte sich aber nach Verlauf von 8 Std., wo die resistente Form in zwei derartigen Röhrchen nachweisbar war, wieder vermehrt. Die folgende Bakterienmenge (bez. 10^{-4}), die von vornherein gering war, nahm im Verlauf von 8 Std. ab und blieb weiterhin klein, am längsten, bis zu 24 Std., in dem Röhrchen (bez. S 10^{-4}), in dem noch nach 46 Std. keine resistente Form angetroffen wurde. Die kleinste Bakterienmenge (bez. 10^{-6}) blieb besonders in dem Röhrchen (bez. Br. sp. 10^{-6}) sehr klein, wo noch nach 46 Std. keine resistente Form nachzuweisen war. In den Röhrchen der anderen Bakterien (S und R) blieb die kleinste Bakterienmenge im Beginn des Versuches auch sehr klein, hatte sich aber nach Verlauf von 8 Std. stärker vermehrt als die ursprünglich 100mal größere Bakterienmenge in derselben Zeit. In diesen Röhrchen (bez. S 10^{-6} und R 10^{-6}) entwickelte sich die resistente Form dann auch rascher als aus der ursprünglich 100mal größeren Bakterienmenge (bez. S 10^{-4} und R 10^{-4}).

Wenn man die bei der Anstellung derartiger Versuche gewonnenen Schalenkulturen betrachtet, wird die Aufmerksamkeit leicht zuerst auf eine andere Erscheinung gelenkt. Dann, wenn man einem Bouillonröhrchen eine kleine Menge Phagenfiltrat und eine verhältnismäßig kleine Bakterienmenge zusetzt und von dem Gemisch sogleich eine Ueberimpfung auf eine gewöhnliche Agarschale vornimmt, wachsen daraus nur gewöhnliche, regelmäßig geformte Kolonien hervor. Wenn ein solches Röhrchen mit seinem Inhalt in den Wärmeschrank gestellt wird und von seinem Inhalt in bestimmten Intervallen Ueberimpfungen auf Agar ausgeführt werden, so kann man feststellen, daß sich zuerst ein kleiner Teil und später die Mehrheit der hervorwachsenden Kolonien zu „Flatter"-Kolonien entwickeln. Je kleiner die Menge des ur-

sprünglich zugesetzten Phagen ist, um so längere Zeit verstreicht, bis diese Erscheinung zutage tritt. Eine von vornherein sehr große Phagenmenge kann bewirken, daß schon aus der unmittelbar nach dem Bakterienzusatz entnommenen Probe ausschließlich „Flatter"-Kolonien wachsen. Wird zu dem Versuch eine ursprünglich sehr reichliche Bakterienmenge benutzt, so kann lange Zeit vergehen, ehe die Phagenwirkung so weit vordringt, daß die „Flatter"-Kolonien in einer auf gewöhnlichem Agar angelegten Kultur die Mehrheit bilden.

Wenn man gleichzeitig die oben beschriebene Erscheinung und das Auftreten der resistenten Form ins Auge faßt, kann man konstatieren, daß die resistente Form sich meistens erst einige Stunden später entwickelt, als die Phagenwirkung in der Kultur soweit vorgeschritten ist, daß aus der Kultur auf gewöhnlichem Agar massenhaft „Flatter"-Kolonien wachsen. Aus manchen Proben wuchsen auf gewöhnlichem Agar ausschließlich „Flatter"-Kolonien hervor, ohne daß man bei der gleichzeitig auf phagenhaltigen Agar vorgenommenen Ueberimpfung resistente Bakterien hätte nachweisen können.

Bei einigen Versuchen wurde das Wachstum eines Phagen-Bakteriengemisches in einer Flüssigkeitsmenge in der Weise verfolgt, daß außer dem Auftreten der resistenten Form auch der Wirkungseffekt des durch Filtrieren aus den entnommenen Proben gewonnenen Phagen ins Auge gefaßt wurde. Eine bedeutende Vermehrung in der Menge des filtrierbaren Phagen setzte sehr bald bei diesen Versuchen ein, vielfach mehrere Stunden, bevor resistente Bakterien nachweisbar waren. Die Vermehrung des filtrierbaren Phagen konnte noch mehrere Stunden fortdauern, nachdem in der Kultur reichliche Mengen resistenter Bakterien festgestellt waren. Dann, wenn die Entwicklung der resistenten Form schnell erfolgte, wurden auch effektiv wirkende Filtrate erhalten.

Als Zusammenfassung des oben Ausgeführten kann man wohl konstatieren, daß ein gewisses Gleichgewicht zwischen kräftigem Bakterienwachstum und der dasselbe merkbar hemmenden Phagenwirkung für die Entwicklung der resistenten Form von Vorteil ist. Sie scheint am schnellsten dann vor sich zu gehen, wenn man eine reichliche Phagenmenge auf eine Bakterienmenge von solcher Größe einwirken läßt, daß sämtliche Zellen der Kultur deutlich unter die Einwirkung des Phagen geraten, daß ihrer aber gleichwohl hinreichend viele vorhanden sind, so daß die Phagenwirkung die Fortdauer des Bakterienwachstums nicht hochgradig zu hemmen vermag. Dieselben Verhältnisse, die eine Entwicklung der resistenten Form fördern, scheinen auch für eine rasche Vermehrung des Phagens von Vorteil zu sein.

Hadley hat seine Aufmerksamkeit besonders auf den Umstand gerichtet, daß sich die S- und R-Formen, wenn eine Bakterienkultur in solche dissoziiert wird, oft gegenüber der Wirkung eines bestimmten Phagen in verschiedener Weise verhalten. Die Wirkung des oben von mir beschriebenen Phagen ist nicht an eine bestimmte Wachstumsform des Bakteriums gebunden. Wenn die ursprüngliche Kultur sich beim Wachsen in gewöhnlicher Bouillon dissoziierte, blieb sowohl die glatte wie die rauhe Form nach wie vor sensibel. Wenn sich die resistente Form entwickelte, war es oft leicht, in demselben Versuchsröhrchen eine resistente S- und eine resistente R-Form zu finden.

Im Verlauf dieser Arbeit war eine geringe Verschiedenheit zwischen S- und R-Form in der Beziehung festzustellen, daß die Gewinnung eines stark, auch lytisch wirkenden Phagenfiltrats leichter zu gelingen schien, wenn man den Phagen zusammen mit der R-Form wachsen ließ. Ein 8—12mal (hintereinander) wiederholtes Wachstum und Filtrieren ergab jedoch immer — ob nun S- oder R-Bakterien dabei verwendet wurden — ein Phagenfiltrat,

das weiterhin sowohl auf die S- wie auf die R-Form kräftig einwirkte. Wenn die Effektivität des Phagenfiltrats in üblicher Weise an Hand eines Wachstumhemmungsversuchs gleichzeitig in parallelen Serien mit S- und mit R-Bakterien untersucht wurde, konnte man zumeist eine kleine Differenz in der entgegengesetzten Richtung konstatieren, indem die Wachstumshemmung der S-Form auch dann deutlicher zutage trat, wenn bei der Bereitung des Phagenfiltrats R-Bakterien benutzt worden waren.

Die Entwicklung der resistenten Form scheint sich allmählich zu vollziehen, so daß es auch mittels eines kräftigen Phagen nicht ganz leicht ist, eine ausschließlich resistente Zellen enthaltende Reinkultur zu erzeugen. In einer auf phagenhaltigem Agar in ganz regelmäßiger Form wachsenden Kolonie kann man mit Hilfe neuer Schalenkulturen oft eine kleine Anzahl sensibler Zellen nachweisen. Die Berücksichtigung dieses Umstandes erwies sich besonders bei solchen Versuchen als wichtig, bei welchen versucht wurde, zur Absorption des Phagen oder seiner fortgesetzten Züchtung resistente Bakterien zu gebrauchen.

Im Anfangsstadium der vorliegenden Arbeit schienen einige Versuche ein dahingehendes Resultat zu ergeben, daß die resistenten Bakterien dazu taugen, die Vermehrung des Phagen aufrechtzuerhalten. Bei genauerer Kontrolle stellte es sich indessen stets heraus, daß die zur Vermehrung oder zur Absorption des Phagen fähige, als resistent angenommene Bakterienkultur auch sensible Zellen enthalten hatte.

Mehrere Male in phagenhaltiger Bouillon gewachsene Bakterien, von denen man mittels wiederholter Schalenkulturen nachgewiesen hatte, daß sie vollkommen resistent waren, absorbierten den Phagen nicht, und der Phage vermehrte sich nicht in einer wachsenden Kultur derselben.

In Tabelle V ist das Ergebnis eines nach dem von Levine und Frisch angegebenen Verfahren ausgeführten Absorptionsversuches, wobei ein durch Züchten mit der sensibeln S-Form verstärktes Phagenfiltrat sowohl von sensibeln wie resistenten S- und R-Bakterien absorbiert wurde, die durch Erwärmen getötet waren. Der Effekt der absorbierten Flüssigkeiten ist in parallelen Versuchsserien gleichzeitig mit Bakterien der sensibeln S- und R-Form festgestellt worden.

Im Schrifttum finden sich mehrere Auslassungen darüber, daß resistente Bakterien den Phagen bisweilen absorbieren können. Ich habe im Zusammenhang mit diesen Aeußerungen niemals einen genauen Bericht darüber entdecken können, auf welche Weise man dabei versucht hat, sensible Bakterien in den betreffenden Kulturen ausfindig zu machen.

Der mittels der oben beschriebenen Methoden aus Reinkulturen mehrere verschiedene Male von mir isolierte filtrierbare Phage schien bei allen meinen Versuchen hinsichtlich seiner Eigenschaften identisch zu sein. Er ließ sich stets mit Leichtigkeit zu annähernd demselben Effekt verstärken. Die mit Hilfe eines bestimmten Phagenfiltrats erzeugte resistente Form war immer auch resistent gegen die Wirkung anderer, aus der ursprünglichen Kultur und deren verschiedenen Wachstumsformen früher isolierten Phagenfiltrate.

Ich habe jedoch mein Hauptaugenmerk nur auf die Herausbringung des Phagen und das Auftreten der resistenten Form gerichtet und nicht alle möglichen Untersuchungsmethoden zur Bestimmung der Eigenschaften des Phagen herangezogen. Da z. B. die Partikelgröße und die Antigeneigenschaften nicht klargelegt worden sind, kann ich keineswegs behaupten, daß alle von mir untersuchten Filtrate unbedingt gleichartig wären.

Nachdem ich mich in der oben beschriebenen Weise mit den Eigenschaften des von mir aus einer Bakterienreinkultur isolierten Phagen vertraut

Tabelle V.

Absorptionsversuch mit vier verschiedenen Bakterienformen. Von jeder wurden die Bakterien aus einem Schrägagarröhrchen in 50 ccm NaCl-Lösung aufgeschwemmt und durch 2stünd. Verweilen im Wasserbad bei 70° C getötet. Von dem Phagenfiltrat wurden in fünf ähnlichen Serien die Verdünnungen 10^{-1}, 10^{-2} usw. bis 10^{-9} gemessen. Jedes Röhrchen enthielt 1 ccm der Bouillonverdünnung. Jedes Röhrchen in der ersten Verdünnungsreihe wurde mit 1 ccm NaCl-Lösung versetzt (Phagenkontrolle), in der zweiten Verdünnungsreihe wurde in alle Röhrchen 1 ccm der Aufschwemmung der abgetöteten ersten Bakterienform eingebracht usw. Alle Röhrchen wurden 18 Std. im Thermostaten bei 37° C gehalten. Dann wurde von jedem Röhrchen je 0,3 ccm in zwei Röhrchen mit 2,7 ccm steriler Bouillon übergeführt, so daß aus jeder Absorptionsreihe zwei neue Verdünnungsserien entstanden. Diese wurden zuletzt in üblicher Weise mit zwei verschiedenen lebendigen sensiblen Bakterien inokuliert und die Wachstumshemmung nach 24 Std. im Brutschrank beobachtet.

Absorbiert mit	Inokuliert mit	Die Verdünnung des Phagenfiltrats nach der Absorption									
		5×10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	Kontr.
—	S	—	±	(+)	+	+	+	+	+	++	++
	R	—	±	(+)	+	+	++	++	++	++	++
S resist.	S	—	±	(+)	+	+	+	+	++	++	++
	R	—	±	(+)	+	+	++	++	++	++	++
S sensib.	S	+	+	++	++	++	++	++	++	×	++
	R	+	++	++	++	++	++	++	++	×	++
R resist.	S	—	±	(+)	+	+	+	+	++	++	×
	R	—	±	(+)	+	+	++	++	++	++	×
R sensib.	S	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++
	R	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

gemacht hatte, habe ich noch nachprüfen wollen, wie sich die bei diesen Versuchen von mir benutzten Bakterien gegenüber anderen Phagen verhalten. Hierbei habe ich in erster Linie zu ermitteln versucht, ob die Wirkung eines anderen Phagen möglicherweise das Hervorkommen des in einer Bakterienkultur verborgenen Phagen fördern kann. Für diese Versuche habe ich mittels der mir zur Verfügung stehenden Bakterien andere Phagen aus Abwasserproben herausgeholt.

Mit verschiedenartigen Phagen ausgeführte Versuche.

Die Auffindung von Phagen in Abwasser wurde nach der Methode von Nyberg unter Verwendung von vier verschiedenen Bakterienformen in gleichzeitigen Versuchsserien bewerkstelligt: 1. die gegen die Wirkung des in der oben beschriebenen Bakterienkultur entdeckten Phagen sensible S-Wachstumsform, 2. die d:o sensible R-Form, 3. die gegen die Wirkung des erwähnten Phagen resistente S-Form, 4. die d:o resistente R-Form.

Die Wasserprobe wurde aus der zu dem flachen Innengebiet des Hafens von Helsinki gehörigen Töölö-Bucht entnommen, in welche aus den umgebenden Straßen und Gärten reichliche Mengen Oberflächenwasser fließen, und in die außerdem die Kloake mündet, die das durch ein biologisches Filter gereinigte Abwasser aus einem Teil der Stadt führt. Die Wasserprobe wurde durch eine Chamberland-Kerze filtriert. Zu 30 ccm Bouillon wurden 3 ccm Wasserfiltrat und eine kleine Menge Bakterien aus einer 24 Std. alten Bouillonkultur (Verdünnung 10^{-4} 0,3 ccm) hinzugefügt. Das Gemisch wurde auf 24 Std. in den Wärmeschrank gestellt, filtriert und die Phagenwirkung jedes einzelnen Filtrates auf die erwähnten vier Bakterienformen bei einem Wachstumshemmungsversuch nach der oben benutzten Methode untersucht.

Im Laufe eines Jahres wurden fünf verschiedene Wasserproben zwecks Auffindung von Phagen entnommen. In diesen wurden zwei verschiedenartige Phagen entdeckt. Wenigstens zweimal konnten beide Phagen aus einer und derselben Wasserprobe isoliert werden.

Die erwähnten Phagen ließen sich dadurch voneinander trennen, daß der eine von ihnen stark auf alle vier Bakterienformen wirkte. Es gelang, ihn auf die Art rein zu isolieren, daß man Bakterien der S-Wachstumsform zu seiner Vermehrung benutzte. Die Verdünnung 10^{-4} des wirksamen Filtrats erwies sich als geeignete Menge für die Züchtung eines neuen kräftigen Filtrats.

Der andere aus Abwasser isolierte Phage übte nur auf die beiden Bakterien der R-Wachstumsform eine kräftige Wirkung aus. Meist war schon das erste Filtrat, das aus wachsenden, der Einwirkung des Wasserfiltrats ausgesetzten R-Bakterien gewonnen wurde, nur in bezug auf R-Bakterien wirksam und ließ sich durch mehrmals wiederholte Weiterzüchtung zusammen mit R-Bakterien leicht reinigen und verstärken.

Unter der Einwirkung eines Wasserfiltrates konnte niemals das Auftreten eines solchen Phagen nachgewiesen werden, dessen Wirkung analog wie die Wirkung desjenigen Phagen gewesen wäre, der früher aus der Bakterienkultur selbst isoliert worden war.

In mehreren Versuchen wurde die unter der Einwirkung der drei verschiedenen Phagen erfolgende Entwicklung der resistenten Form auf die Weise verfolgt, daß von einer der Phagenwirkung ausgesetzten wachsenden Bakterienkultur gleichzeitig Ueberimpfung auf gewöhnlichen Agar und auf dreierlei Phagenagarschalen vorgenommen wurden. Alle drei Phagen, der aus der Bakterienkultur und die beiden aus Wasserfiltraten gewonnenen, waren in bezug auf die Entwicklung der resistenten Form völlig voneinander unabhängig, spezifisch. Niemals konnte mit Sicherheit festgestellt werden, daß die Wirkung eines Phagen zur Entstehung einer solchen Bakterienform Veranlassung gegeben hätte, die gegen die Wirkung eines anderen Phagen resistent gewesen wäre. Ebensowenig ließ sich nachweisen, daß eine gegen die Wirkung eines bestimmten Phagen resistente Bakterienform unter dem Einfluß irgendeines anderen Phagen ihre Resistenz gegenüber dem ersterwähnten Phagen eingebüßt hätte.

Ein anschaulicher Beleg dafür, daß die drei von mir verwendeten Phagen alle zu verschiedenen Resistenzgruppen — nach der von Burnet gebrauchten Bezeichnung — gehörten, war dadurch zu erreichen, daß man aus der gegen die Wirkung aller drei Phagen sensibeln R-Form mit Hilfe der Phagen sieben neue Bakterienformen entwickeln konnte, von denen jede in eigener Weise gemäß dem in Tabelle VI wiedergegebenen Schema gegen die Wirkung eines, zweier oder dreier Phagen resistent war.

Tabelle VI.

Schematische Darstellung der Bakterienformen, welche durch die Wirkung von drei verschiedenen Phagen aus einer ursprünglich sensiblen Bakterienkultur, Nr. 1, zu erhalten sind.

Art der Phagen	Nr. der Bakterienform							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	+	+	+	+	—	—	—	—
B	+	+	—	—	+	+	—	—
C	+	—	+	—	+	—	+	—

+ = sensibler Bakterienstamm, positive Phagenwirkung
— = resistenter „ , keine „

In Tabelle VII ist das Resultat eines nach der früher angewandten Methode ausgeführten Wachstumshemmungsversuchs wiedergegeben, der mit derartigen Bakterien angestellt worden ist.

Tabelle VII.

Drei verschiedene Phagenfiltrate: A aus den Bakterienkulturen, B aus Abwasserproben mit S-Bakterien, C aus Abwasserproben mit R-Bakterien gewonnen. Alle drei Filtrate wurden in gleichzeitigen Verdünnungsreihen mit acht Bakterienformen inokuliert. Das Resultat wurde nach 24 Std. abgelesen.

Bakterienform	Filtrat	in Verdünnungen										
		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	Kontr.
1	A	—	—	—	(+)	(+)	(+)	+	+	+	+	+
2		—	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+
3		—	—	—	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+	+	+
4		—	—	—	—	(+)	(+)	(+)	+	+	+	+
5		+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+
6		+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+
7		(+)	+	.	.	.	.	.	.	.	.	+
8		+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+
1	B	—	+	—	—	—	(+)	(+)	+	+	.	+
2		—	—	—	—	(+)	(+)	(+)	+	+	.	+
3		(+)	+	.	.	.	.	.	.	.	.	+
4		+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+
5		—	—	—	—	—	(+)	(+)	(+)	+	.	+
6		—	—	—	—	(+)	(+)	(+)	+	+	.	+
7		+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+
8		+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+
1	C	—	(+)	(+)	(+)	—	(+)	(+)	(+)	+	.	+
2		+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+
3		—	—	—	—	—	—	(+)	(+)	+	.	+
4		(+)	(+)	(+)	+	.	.	.	.	.	.	+
5		—	—	—	(+)	—	—	(+)	+	+	.	+
6		(+)	+	.	.	.	.	.	.	.	.	+
7		—	—	—	—	(+)	—	(+)	(+)	+	.	+
8		+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+

Beim Anstellen von Versuchen der oben beschriebenen Art schien es gleichgültig zu sein, in welcher Reihenfolge man die verschiedenen Phagen einwirken ließ, um eine gegen sie alle resistente Bakterienform zu erzeugen. Dagegen war man auch bei Verwendung der aus Abwasser isolierten starken Phagen zu den Versuchen gezwungen, darauf zu achten, daß die Bakterienkultur der Einwirkung eines Phagen oft mehrere verschiedene Male ausgesetzt werden mußte, bevor eine Kultur erzielt wurde, in der man bei Ueberimpfungen auf phagenhaltige Agarschalen keine sensiblen Zellen mehr nachweisen konnte.

In diesem Zusammenhang ist es am Platze, darauf aufmerksam zu machen, daß der eine Abwasserphage (bez. C), der lediglich auf die R-Form des Bakteriums einwirkte, sich gerade wegen dieser seiner Eigenschaft in mancher Beziehung anders als die beiden anderen Phagen verhält und dadurch die Beurteilung einiger Versuche erschweren konnte. Die Dissoziierung der in bloßer Bouillon wachsenden Bakterien ohne spezifische Phagenwirkung wandelt die resistente S-Form in die gegen diesen Phagen sensible R-Form um und umgekehrt. Da in einer der Phagenwirkung unterliegenden Kultur fast immer eine mächtige Dissoziierung im Gange ist, ist es oft beinahe unmöglich, zu sagen, welche Resistenzveränderung von der Dissoziierung und welche von

der eigentlich spezifischen Phagenwirkung herrührt. Bei einigen Versuchen konnte auch das Auftreten einer gegen die Wirkung dieses Phagen resistenten R-Form konstatiert werden. Bei der vorliegenden Arbeit habe ich zu einer genauen Untersuchung der Eigenschaften dieses interessanten Phagen keine Zeit gefunden.

D'Herelle, Asheshov, Morison haben bei ihren mit verschiedenen Bakterienarten angestellten Versuchen gezeigt, daß eine besonders starke Phagenwirkung oft nur dann zu erreichen ist, wenn man mehrere Phagen zusammen auf eine wachsende Bakterienkultur einwirken läßt. Ich habe einige Wachstumshemmungsversuche in der Weise ausgeführt, daß ich in gleichzeitig inokulierten Phagenverdünnungsserien sowohl jeden der drei Phagen für sich allein, als auch ein Gemisch aus zwei oder drei Phagen benutzt habe. Hierbei hat sich nicht selten feststellen lassen, daß ein Gemisch deutlich kräftiger wirken kann als der kräftigste der dazu verwendeten Phagen für sich allein. Insbesondere eine vollständige lytische Wirkung kann bei einem Gemisch in 10—100fach größerer Verdünnung zum Vorschein kommen. Bei manchen Versuchen gewann man den Eindruck, daß die Anwesenheit des schwächsten, aus der Bakterienkultur selbst isolierten Phagen in dem Gemisch die Entwicklung der resistenten Form in starken Phagenkonzentrationen beschleunigte.

Zusammenfassung.

Aus einer Reinkultur von Salmonella typhi murium (Breslau), die in den Sammlungen des Instituts zwei Jahre lang auf Schrägagar gezüchtet war, konnte ein filtrierbarer Phage auf zweierlei Weise isoliert werden:

1) Durch Ueberimpfungen von den beim Wachsen in Bouillon dissoziierten Kulturen auf Agarplatten und wiederholte Ueberimpfung von den hierbei wachsenden sehr kleinen Kolonien in Bouillon und wieder auf Agar. Hierbei begannen in den Schalenkulturen typische „Flatter"-Kolonien aufzutreten, aus denen der Phage leicht zu isolieren war.

2) Durch Züchten der Bakterien in Bouillon nach der von Fukuda angegebenen Methode, wobei die Bakterienmasse nach dem Zentrifugieren täglich in neue Bouillon übergeführt wurde. Gleichzeitig mit dem filtrierbaren Phagen erschienen auch hier „Flatter"-Kolonien in den in Agarplatten angelegten Kulturen.

In der Wirkung des Phagen auf die aus der ursprünglichen Kultur nach deren Dissoziierung isolierten S- und R-Wachstumsformen waren nur geringfügige Unterschiede festzustellen. Der Phage vermochte sowohl die Entstehung einer resistenten S-Form als auch einer resistenten R-Form herbeizuführen.

Die Entwicklung der resistenten Form ließ sich leicht verfolgen, indem man von den zu untersuchenden Proben gleichzeitig eine Impfung auf eine gewöhnliche Agarschale und auf phagenhaltigen Agar vornahm, wobei man unschwer eine kleine Menge Kolonien resistenter Zellen unter den sensiblen entdecken konnte und umgekehrt.

In einer auf phagenhaltigem Agar vollständig regelmäßig wachsenden Kolonie können jedoch auch sensible Zellen vorhanden sein, so daß wieder-

holte Ueberimpfungen auf Phagenagar erforderlich sind, bevor man es als wahrscheinlich betrachten kann, daß eine bestimmte Kultur ausschließlich resistente Bakterien enthält.

In den ursprünglichen und den dissoziierten Kulturen waren weder vor dem Auftreten des Phagen, noch während der Zeit seines ersten Auftretens resistente Bakterien zu entdecken.

Die Zeit, die bis zur Entstehung der resistenten Form verstrich, war hochgradig von den ursprünglich zu dem Versuch verwendeten Phagen- und Bakterienmengen abhängig. Die resistente Form schien dann am schnellsten (binnen 4—8 Std.) zu entstehen, wenn man eine hinreichend große Phagenmenge auf eine reichliche Bakterienmenge einwirken ließ. Eine relativ zu große Phagen- oder Bakterienmenge verzögerte die Entstehung der resistenten Form.

Die gleichen Verhältnisse, welche die Entstehung der resistenten Form förderten, erwiesen sich auch als günstig für eine rasch erfolgende Vermehrung des Phagen.

Die nachgewiesenermaßen völlig resistenten Bakterienkulturen absorbierten den Phagen nicht, und der Phage vermehrte sich nicht in einer wachsenden Kultur derselben.

Mittels der untersuchten Bakterien konnte in Abwasserfiltraten kein solcher Phage aufgefunden werden, wie er in der Bakterienkultur selbst anzutreffen war.

Aus Abwasserfiltraten wurden zwei verschiedenartige, stark wirksame Phagen isoliert, die beide hinsichtlich der Entwicklung der ihnen gegenüber resistenten Bakterienform völlig spezifisch waren. Ihre Wirkung war weder imstande, den in den Bakterienkulturen verborgenen Phagen herauszubringen, noch ein gegen die Einwirkung des aus den Kulturen isolierten Phagen resistente Bakterienform entstehen zu lassen.

Schrifttum.

Asheshov, I. N., et alii, Ind. J. med. Res. **17**, 971 (1930); ref. nach Morison. — Bergstrand, H., Zbl. Bakter. I Orig. **116**, 481 (1930). — Burnet, F. M., Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc. **9**, 332 (1934). — Fukuda, Y., Z. Immun.forschg **54**, 369 (1928). — Gildemeister, E., u. Herzberg, K., Zbl. Bakter. I Orig. **91**, 12 (1923); **93**, 402 (1924). — Grumbach, A., Zbl. Bakter. I Orig. **118**, 206 (1930). — Hadley, P., J. inf. Dis. **40**, 1 (1927); **42**, 263 (1928); **60**, 129 (1937). — D'Herelle, F., Le Bactériophage et son Comportement. Paris, Masson, 1926; ref. nach Morison. — Kline, G. M., J. Lab. clin. Med. **12**, 1074 (1927); ref. nach Burnet. — Klieneberger, E., Zbl. Bakter. I Orig. **123**, 318 (1932). — Levine, P., u. Frisch, A. W., J. inf. Dis. **57**, 104 (1935). — Morison, J., Bacteriophage in the Treatment and Prevention of Cholera. London, Lewis u. Co., 1932. — Nyberg, C., Zbl. Bakter. I Orig. **141**, 363 (1938); **142**, 178 (1938). Acta Path. Microb. Scand. Suppl. **37**, 401. — Ders., Zbl. Bakter. I Orig. **122**, 270 (1931).

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität Graz
(Vorstand: Professor Dr. Heinrich Reichel).]

Ueber den Aminosäurestoffwechsel verschiedener ruhender Staphylokokken.

Von Privatdozent Dr. med. Dr. phil. **Franz Lieb**
und Dr. med. **Berta Vallender.**

In einer vorhergehenden Arbeit hat einer der beiden Autoren (Lieb) gemeinschaftlich mit Reichelt das Verhalten ruhender Staphylokokken gegen Aminosäuren untersucht. Es wurde methodisch in der Weise vorgegangen, daß nicht die Abspaltung von Ammoniak aus der Aminosäure bestimmt, sondern direkt die Abnahme der Aminosäure nach der Methode von Folin beobachtet wurde. Obwohl diese Versuche mit einer anderen Methode durchgeführt wurden als die von O. Ehrismann und K. Dramburg, stimmen die Ergebnisse sinngemäß überein, d. h. in beiden Fällen zeigte das Alanin eine leichtere Spaltbarkeit durch den Staphylococcus pyogenes aureus als das Glyzin (Glykokoll).

O. Ehrismann und K. Dramburg beschreiben gelegentlich einer Untersuchung über die Verwertbarkeit von Aminosäuren durch Streptokokken über Ammoniakbildung durch den ruhenden Micrococcus pyogenes aureus aus Glykokoll und Alanin. Nach diesen beiden Autoren kam es bei einem untersuchten Stamm nach 6 Std. zur Abspaltung von Ammoniak aus dem Glykokoll, aber bereits nach 2 Std. zur Abspaltung von Ammoniak aus dem Alanin.

Ferner berichten auch Kendall und seine Mitarbeiter im Rahmen einer ausgedehnten Untersuchung über den Stoffwechsel verschiedener ruhender Bakterien auch über die Spaltbarkeit des Alanins durch den ruhenden Staphylococcus aureus.

In vorliegender Arbeit wurden nun die früheren Versuche von Lieb und Reichelt erweitert. Es wurde die Reaktionszeit über 48 Std. hinaus ausgedehnt, es wurden noch zwei weitere Aminosäuren untersucht und sowohl Hautkokken als auch Luftkokken außer den pathogenen Kokken in die Untersuchung einbezogen. Da in der homologen Reihe des Alanin reine optische Isomere in Form des käuflichen d-Valins und l-Valins (Schuchardt) erhältlich sind, wurden auch diese einer Untersuchung unterzogen.

Es ist also die Aufgabe vorliegender Arbeit festzustellen: 1. Wie verhalten sich weitere Glieder der homologen Reihe des Alanin. 2. Ist ein Unterschied bei optischen Isomeren in der Reaktionsfähigkeit feststellbar. 3. Wieweit finden sich zwischen morphologischen Eigenschaften der Kokken und der Reaktionsfähigkeit Beziehungen.

Zu den folgenden Versuchen wurde die Methode Folin wie in früheren von Lieb und Reichelt eingehalten, und es wurde auch die Reaktionszeit verlängert. Es sei zunächst diese Untersuchungstechnik noch einmal und etwas ausführlicher beschrieben: Eine 24 Std. alte Schrägagarkultur wird

mit 8 ccm Aminosäurelösung (0,1 Proz. in phys. Kochsalzlösung) abgeschwemmt und 3mal 24 Std. bei 37° bebrütet. Nach dem Bebrüten wird 1 g Permutit (Natriumpermutit) nach Folin zur Bindung des Ammoniak zugesetzt, 5 Min. lang geschüttelt und dann filtriert, 2 ccm des Filtrates werden zur Aminosäurebestimmung verwendet. In gleicher Weise wird mit einem Kontrollröhrchen, enthaltend 2 ccm Aminosäurelösung und einem Kontrollröhrchen, enthaltend 2 ccm Wasser, eine Aminosäurebestimmung angestellt. Die Prüfung auf Aminosäure wird nun durchgeführt, indem man 1 ccm 0,1 normale Salzsäure, 1 ccm 2,5proz. Sodalösung (kristallisiert) und 5 ccm einer frisch bereiteten 0,5proz. Lösung von naphtochinonmonosulfosaurem Natrium (1 : 2 : 4) zusetzt, 24 Std. im Dunkeln aufbewahrt und hierauf 1 ccm Essigsäure-Azetatgemisch (hergestellt aus 100 ccm 50proz. Essigsäure und 100 ccm 5proz. Natriumazetat) und hierauf noch 5 ccm einer 4proz. Natriumthiosulfatlösung zusetzt. Rotfärbung zeigt Anwesenheit von Aminosäure an. Ammoniak würde ebenfalls Rotfärbung verursachen, wurde jedoch durch das Permutit entfernt. Gelbfärbung zeigt Abwesenheit von Aminosäure und von Ammoniak an.

Die Versuchszeit betrug 3mal 24 Std. und 6mal 24 Std. Die Ergebnisse wurden in der Tabelle niedergelegt. Es fanden zu den Versuchen folgende Stämme Verwendung: 1. St 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, pathogene Stämme des typischen Staphylococcus aureus aus Eiterherden frisch isoliert, mit den typischen morphologischen Eigenschaften und der typischen Farbstoffbildung. 2. Luftstämme L 1 und L 3 bis L 9, aus der Laboratoriumsluft isolierte Stämme, die auch kurz beschrieben werden sollen. L 1 Staphylokokkus ockergelb, mittelgroß, L 3 Staphylokokkus lichtockergelb, klein, L 4 Staph. albus, mittelgroß, weiß, L 5 mittelgroße zitronengelbe Sarzine, L 6 mittelgroße dunkelgelbe Sarzine, L 7 kleiner dunkelockergelber Staphylokokkus, L 8 kleine zitronengelbe Sarzine, L 9 großer weißer Staphylokokkus. 3. Hautstämme: von der Haut von 8 gesunden Menschen isoliert. Kr 1 blaßgelbe mittelgroße Sarzine, Kr 2 weiße mittelgroße Sarzine, H 2 große weiße Staphylokokken, H 1 blaßgelbe große Sarzine, K 1 farblose große Kokken, K 2 mittelgroße weiße Kokken, K 3 kleine weiße Kokken, N 1 mittelgroße gelbe Sarzine, Pt große gelbe Sarzine, S 1 weiße kleine Sarzine, Pl 1 mittelgroße orangefarbige Kokken. Pl 2 mittelgroße weiße Kokken, Li 2 mittelgroße Kokken.

Pathogene Staphylokokken, Alaninspaltung							
	St 1	St 3	St 5	St 6	St 7	St 8	St 9
3mal 24 Stunden	++	++	++	++	++	++	++

Luftstämme, Alaninspaltung								
	L 1	L 3	L 4	L 5	L 6	L 7	L 8	L 9
3mal 24 Stunden	+	+	++	—	—	++	±	+
6mal 24 Stunden				—	+			

Hautstämme, Alaninspaltung													
	Kr 2	Kr 1	H 2	H 1	K 1	K 2	K 3	Ni	Pt	S	Pl 1	Pl 2	Li 2
3mal 24 Std.	++	—	—	++	+	±	++	—	—	±	+	++	+
6mal 24 Std.		++	++					++	++				

— negativ, ± Spur zersetzt, + schwach zersetzt, ++ schwach zersetzt.

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, tritt beim Alanin eine starke Reakt· ein. Es blieb jedoch sowohl beim d-Valin als auch beim ' Valin wider warten jede Spaltung aus. Jedoch lassen sich morphologische Beziehun zur Reaktionsfähigkeit gegen Alanin in groben Umrissen erkennen. Es zeig alle pathogenen Staphylokokkenstämme starke Spaltung de Alanins inn halb 3mal 24 Std., während die Haut- und Luftkokken nur zum Teil star Spaltung, zum Teil schwache oder gar keine Spaltung aufwiesen. Luft- und Hautstämme zeigten keine Unterschiede gegeneinander. Jedoch läßt sich innerhalb dieser beiden Stämme wiederum eine Gruppierung erkennen in dem Sinne, daß gelbe Sarzinen das Alanin am trägsten spalten. Unter 7 gelben Sarzinen spaltete nur eine H 1, das Alanin stark in 3mal 24 Std. eine L 8 nur in Spuren und die übrigen 5 Keime L 5, L 6, Kr 1, N 1, Pt überhaupt nicht. Anderseits spaltete von 9 weißen Saprokokken nur eine H 2 das Alanin in 3mal 24 Std. gar nicht, 8 spalteten das Alanin, davon 4 Stämme Pl 2, K 3, Kr 2, L 4 sehr stark, die übrigen schwächer. Gelbe Luftkokken, die nicht Sarzinen waren, bleiben deutlich in ihrer Spaltungsfähigkeit hinter den pathogenen Stämmen zurück. Während alle pathogenen Stämme starke Alaninspaltung in 3mal 24 Std. aufwiesen, wiesen die 3 verwendeten gelben Saprokokken L 3, L 1, Pl 1 nur schwache Alaninspaltung auf.

Schließlich wurde noch die Reaktionsfähigkeit der Haut, Luft und pathogenen Kokken gegen Kreatinin einer Untersuchung unterzogen. 5 ccm einer 0,1proz. Lösung von Kreatinin in physiol. Kochsalzlösung wurde zum Abschwemmen der Schrägagarkultur verwendet und die abgeschwemmte Kultur in einer Eprouvette mit Watte verschlossen 3mal 24 Std. bei 37° stehen gelassen. Hierauf gibt man in jedes Röhrchen 5 ccm einer gesättigten, frisch bereiteten, ungefähr 1,2proz. Pikrinsäurelösung und einen ccm 10proz. Kalilauge. Rotfärbung nach einigen Minuten zeigt Anwesenheit von Kreatinin an (negativer Verlauf). Gelbfärbung zeigt Abwesenheit von Kreatinin an (positiver Verlauf). Ferner wird in einer Eprouvette eine Vergleichsprobe mit 5 ccm Kreatininlösung und eine Vergleichsprobe mit 5 ccm destilliertem Wasser angesetzt. Die Methode des Kreatininnachweises beruht darauf, daß Kreatinin mit der Pikrinsäure in alkalischer Lösung eine Rotfärbung gibt (Folin). In sämtlichen Versuchen zeigte es sich jedoch, daß Kreatinin durch ruhende Kokken, Hautkokken, Luftkokken und pathogene Staphylokokken nicht gespalten wurde.

Zusammenfassung.

Es wurde die Spaltung von Alanin, d-Valin, l-Valin und Kreatinin durch pathogene Staphylokokken, Hautkokken und Luftkokken untersucht. Nur das Alanin erwies sich als spaltbar. Pathogene Staphylokokken zeigten durchwegs starkes, saprophytische Kokken durchschnittlich weniger starkes Spaltungsvermögen. Unter den saprophytischen Kokken zeigten wiederum die gelben Sarzinen durchschnittlich schwächeres Spaltungsvermögen als weiße Saprokokken. Ein Unterschied zwischen Hautkokken und Luftkokken konnte nicht festgestellt werden.

Schrifttum.

Kendall u. Mitarbeiter, Zbl. Hyg. **26** (1931). — Ehrismann u. Dramburg, Z. Hyg. **119**, 626 (1937). — Lieb u. Reichelt, Zbl. Bakter. I Orig. **142** (1938).

Verantwortlich für die Redaktion: Prof. Dr. E. Gildemeister, Berlin-Dahlem, Unter den Eichen 93 II. Verantwortlicher Anzeigenleiter: Hans Schulz, Jena. Verlag und Anzeigenannahme: Gustav Fischer, Jena. D. A. 3. Vj. 1939: 1300. Druck: Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle), Jena/6849. Printed in Germany.

Inhaltsverzeichnis.

I. Verzeichnis der in Band 144 enthaltenen Arbeiten.

Die mit * bezeichneten Seitenzahlen beziehen sich auf den Bericht über die 1. Großdeutsche (18.) Tagung der „Deutschen Vereinigung für Mikrobiologie", der als Beiheft zu Bd. 144 (Heft 1/5) gedruckt wurde.

II. Sachverzeichnis.

A.

B.

C.

Druckfehlerberichtigung

zu E. Traub und W. Schäfer, Serologische Untersuchungen über die Immunität der Mäuse gegen die lymphozytische Choriomeningitis, Bd. 144, H. 6.

Auf S. 344, 26. Zeile von oben, ist das letzte Wort „nicht“ zu streichen. Der betr. Satz muß also lauten: „Dem ist aber die Erfahrungstatsache entgegenzuhalten, daß es durch intravenöse Impfung mit hochwertigen Immunseren von Meerschweinchen leicht gelingt, Mäuse gegen die intrazerebrale Infektion mit sehr kleinen Dosen Pferdeenzephalitisvirus passiv zu immunisieren.“